ALKOHOL UND LIPIDPEROXIDATION IN RATTEN-LEBERMITOCHONDRIEN: EINFLUSS VON GESCHLECHT, DIÄT UND SAUERSTOFFDRUCK

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Joachim Haselbach
aus Nordstrand

1980

80 335

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0058

ALKOHOL UND LIPIDPEROXIDATION IN RATTEN-LEBERMITOCHONDRIEN: EINFLUSS VON GESCHLECHT, DIÄT UND SAUERSTOFFDRUCK

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Joachim Haselbach
aus Nordstrand

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 1980

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Pfaff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

A b s t r a c t

HASELBACH, JOACHIM:

ALKOHOL UND LIPIDPEROXIDATION IN RATTENLEBERMITOCHONDRIEN: EINFLUSS VON GESCHLECHT, DIÄT UND SAUERSTOFFDRUCK

Der peroxidative Angriff bestimmter Sauerstoffspezies auf ungesättigte Fettsäuren der Membran (Lipidperoxidation: LPO) wird oft als Ursache der Primärläsion nach chronischen Alkoholgaben postuliert, wobei die LPO in vitro allgemein durch exogenes Fe/ADP induziert und über Malondialdehyd bestimmt wird.

Hier wird dagegen gezeigt, daß die Suszeptibilität von Mitochondrien gegenüber LPO nach chronischer Alkoholvorbehandlung verringert ist. Der Grad der Erniedrigung der LPO ist streng korreliert mit der beobachteten Abnahme der energetischen Kopplung der Mitochondrien: Je besser die Kopplung, was besserer Energetisierbarkeit gleichzusetzen wäre, desto höher die LPO. Diese Korrelation wird verifiziert mit Modellsubstanzen, die über unterschiedliche Beeinflussung der Energetisierungsfähigkeit der mitochondrialen Membran, die LPO erwartungsgemäß zu stärken oder zu schwächen vermögen. Es wird gezeigt, daß Verringerung der energetischen Kopplung nach chronischen Alkoholgaben mit veränderten permeativen Eigenschaften der mitochondrialen Membran korreliert werden kann, wie Zunahme der Protonenpermeabilität und Abnahme der energieabhängigen Kalium- und Calciumaufnahme. Verfütterung gesättigter Fettsäuren zeigt gleichsinnige Veränderungen wie nach chronischen Alkoholgaben. Diese lassen sich ursächlich aus ähnlich veränderter Fettsäurenzusammensetzung der Membran herleiten. Sie wurden durch gaschromatographische Analyse nachgewiesen. Lebermitochondrien weiblicher Tiere zeigen auch ohne Vorbehandlung mit Alkohol einen geringeren Kopplungsgrad als die männlicher Kontrolltiere. Dies ist aber nur z. T. mit einem geänderten Fettsäuremuster zu erklären. Nach Alkoholvorbehandlung oder Palmindiät ändert er sich kaum weiter.

Wenn auch gezeigt wird, daß Kopplungsgrad und LPO parallel verringert sind, so macht doch verstärkte Atmung nach Alkoholvorbehandlung relative Verarmung des Gewebes an Sauerstoff in vivo wahrscheinlich. Unter diesen Bedingungen aber wird eine relative Zunahme der LPO nachgewiesen.

In einem Modell, das die beschriebenen Beobachtungen ohne Inanspruchnahme des "microsomal ethanol oxidising system" erklärt, kommt über der besonderen Rolle des Cytochrom c dem kalorigenen Energieverschleiß nach chronischen Alkoholgaben besondere Bedeutung zu. Der postulierte Energieverschleiß ergibt sich als Folge der Permeabilitätsveränderungen der Membran, wobei diese als adaptative Antwort auf chronische Alkoholgaben verstanden werden können: Sie wirkt über Veränderung des Fettsäuremusters der LPO entgegen, was besonders für die unter niedrigem Sauerstoffdruck relativ erhöhte LPO wichtig ist.

Die Untersuchungen dieser Dissertation wurden von Januar 1978 bis Januar 1980 im Institut für Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. med. H. Remmer) unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Pfaff durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Pfaff möchte ich für das außerordentliche Interesse an der Arbeit und jede notwendige Unterstützung danken.
Herrn Prof. Dr. Remmer sei gedankt für die Hinführung zu den Untersuchungen über Alkoholwirkungen an Rattenlebermitochondrien (Inhalt der Diplomarbeit).

Herrn Dr. Frank und Herrn Hintze (beide Toxikologisches Institut) danke ich für die Mitarbeit bzw. Anleitung zur gaschromatographischen Bestimmung von Fettsäuren und Kohlenwasserstoffen.
Herr v. Hees (Pharmakologisches Institut) war bei der Calcium-Bestimmung mit einem Atomabsorptionsspektrophotometer behilflich.
Herr Dr. Krell (Toxikologisches Institut) arbeitete mit an der Bestimmung des Membranpotentials und an Messungen von Calcium- und Kaliumbewegungen an der Mitochondrienmembran.
Die polarographischen Bestimmungen der Redoxpotentiale verschiedener Entkoppler wurden zusammen mit Herrn Ladzer (Pflanzenphysiologisches Institut) durchgeführt.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden als Kurzvorträge gehalten. Diese sind in Abstractform veröffentlicht:

- J. Haselbach, E. Pfaff and H. Remmer
  "Peroxidation of Mitochondrial Lipids of Rat Liver Following Chronic and Acute Alcohol Treatment"
  Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. to Vol. 302, R 20 (1978)
- J. Haselbach and E. Pfaff
  "Influence of Alcohol on Rats Under Different Diets on the Dependence of Lipid Peroxidation on the State of Mitochondria"
  International Symposium on Metabolic Effects of Alcohol, Milan, June 18-21 (1979), Abstract Vol., p. 132
- J. Haselbach and E. Pfaff
  "Lipidperoxidation in Rat Liver Mitochondria with Low Oxygen Concentrations"
  Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl. to Vol. 311, R 27 (1980)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL und METHODEN	5
2.1.	Material	5
2.1.1.	Versuchstiere	5
2.1.2.	Tierfütterung	5
2.1.3.	Chemikalien, Enzyme und Coenzyme	5
2.1.4.	Geräte	6
2.2.	Methoden	8
2.2.1.	Isolation von Mitochondrien	8
2.2.2.	Inkubationen unter normalem Sauerstoffdruck	8
2.2.2.1.	Inkubationen für die Induktion der LPO	8
2.2.2.2.	Messung der Initialradikalbildung	9
2.2.2.3.	Calciumaufnahme und -wiederabgabe	10
2.2.2.4.	Bestimmung des Membranpotentials	10
2.2.2.5.	Messung von Kaliumaufnahme und -wiederabgabe	10
2.2.2.6.	Messung der Normalpotentiale von Entkopplern	10
2.2.3.	Inkubation unter verringertem Sauerstoffdruck	10
2.2.4.	Analytische Methoden	13
2.2.4.1.	Bestimmung des Atmungskontrollquotienten (ACR)	13
2.2.4.2.	Darstellung von Malondialdehyd	14
2.2.4.3.	Die Thiobarbitursäurereaktion	14
2.2.4.4.	Aufarbeitungsmethode für die Fettsäurenanalyse	14
3.	ERGEBNISSE	16
3.1.	Bestimmung des Atmungskontrollquotienten (ACR)	16
3.1.1.	Abhängigkeit des ACR von der Proteinmenge	16
3.1.2.	Der ACR nach chronischen Alkoholgaben	16
3.1.2.1.	ACR bei männlichen Ratten, gefüttert mit Standard- oder Palmindiät	16
3.1.2.2.	ACR bei weiblichen Ratten, gefüttert mit Standard- oder Palmindiät	18
3.2.	Messung der Lipidperoxidation (LPO)	19
3.2.1.	LPO unter normalem Sauerstoffdruck	19
3.2.1.1.	Veratmung von Malondialdehyd (MDA)	19
3.2.1.2.	Bildung von Malondialdehyd nach chronischen Alkoholgaben	21
3.2.1.3.	Bildung von Alkanen nach chronischen Alkoholgaben	24

		Seite
3.2.1.4.	Diätabhängige LPO in Rattenlebermitochondrien nach chronischen Alkoholgaben	25
3.2.1.5.	Abhängigkeit der LPO vom akzidentiellen ACR nach chronischen Alkoholgaben	27
3.2.1.6.	Manipulation der LPO in Rattenlebermitochondrien	28
3.2.1.6.1.	Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung	28
3.2.1.6.2.	Atmungsketteninhibitoren	33
3.2.1.6.3.	Anionen, Kationen und andere Substanzen	36
3.2.1.7.	Messung der Initialradikalbildung	42
3.2.2.	LPO unter erniedrigtem Sauerstoffdruck	44
3.3.	Bestimmung weiterer Parameter nach chronischen Alkoholgaben	47
3.3.1.	Messung der Protonenpermeabilität	47
3.3.2.	Messung von Calciumaufnahme und -wiederabgabe	49
3.3.2.1.	Titration von Mitochondrien mit Calcium	49
3.3.2.2.	Calciumaufnahme und -wiederabgabe nach Lanthan	51
3.3.2.3.	Endogene Calciummengen in Mitochondrien	55
3.3.3.	Kaliumaufnahme und -wiederabgabe	56
3.3.4.	Membranpotential	56
3.3.5.	Atmungsraten von Rattenlebermitochondrien	59
3.3.5.1.	Atmungsraten nach chronischen Alkoholgaben	59
3.3.5.2.	Abhängigkeit der mitochondrialen Atmung von NADH und Cytochrom c	61
3.3.6.	Körpergewichte und Energieverbrauch nach chronischen Alkoholgaben	63
3.4.	Die Fettsäurenzusammensetzung der Mitochondrienmembranen	67
4.	DISKUSSION	73
4.1.	THEORETISCHER TEIL: SPEZIELLE ERGEBNISORIENTIERTE DISKUSSION	73
4.1.1.	Allgemeines Modell der Induktion, Promotion und Inhibition der LPO in Mitochondrien	73
4.1.2.	Die Abhängigkeit der LPO vom energetischen Zustand der Mitochondrienmembran	77
4.1.2.1.	Die Bildung des Superoxid-Radikals	77
4.1.2.2.	Die Inaktivierung des Superoxid-Radikals	80
4.1.2.3.	Einfluß der Protonenpermeabilität und die Wirkung von Entkopplern	81
4.1.3.	Abbauwege des Alkohols	85

		Seite
4.1.3.1.	Der NADH-Cytochrom c-Reduktase Weg	85
4.1.3.2.	Die Bedeutung der Abnahme des ACR nach chronischen Alkoholgaben	88
4.1.4.	Hypoxie und Alkohol	89
4.2.	ALLGEMEINE DISKUSSION	92
4.2.1.	Bemerkungen zur Bestimmung des ACR	92
4.2.2.	Bemerkungen zur Bestimmung der LPO	95
4.2.3.	Bedeutung der LPO für membranale Veränderungen	97
4.2.4.	Membranveränderungen nach chronischen Alkoholgaben	98
5.	ZUSAMMENFASSUNG	100
6.	LITERATUR	103
7.	ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN	114
7.1.	Abkürzungen	114
7.2.	Definition von Energetisierung und Kopplung	114
8.	ANHANG	115
8.1.	Die Wirkung von Entkopplern auf den ACR	115
8.2.	Redoxpotentiale verschiedener Entkoppler	116
8.3.	Fettsäurenzusammensetzung der Diäten	117

1. EINLEITUNG

Alkoholwirkungen auf die Leber sind vielfältig.

Akute Stoffwechselwirkungen und damit korrelierte morphologisch faßbare Veränderungen sind voll reversibel.

Aber auch chronische Aufnahme von Alkohol führt zunächst nur zur Adaptation an diese Veränderungen, wie noch deutlich gemacht wird, und dann erst in der Tendenz zu toxischen Einflüssen. Auch diese sind reversibel. Doch kann - besonders beim Menschen - chronischer Alkoholabusus zur irreversiblen Schädigung, der Leberzirrhose (1), führen. Die Kausalkette zwischen den beobachteten reversiblen Veränderungen an der Leberzelle und den Ereignissen, die zur Leberzellnekrose führen, ist nicht geschlossen; ja die ursächlichen toxischen Ereignisse sind ihrer Natur nach noch nicht einmal bekannt. Dies gilt auch für die häufig auftretenden entzündlichen Prozesse, wie die Alkoholhepatitis (2,3). Die unbestimmt lange Latenzzeit bis zum Auftreten der irreversiblen Schädigung wird nicht verstanden. Die Lipidperoxidation (LPO) ist eine mögliche Ursache. Ihre Beteiligung bei Leberschädigungen, z.B. bei der CCl_4-Wirkung, ist nachgewiesen. Hinsichtlich der Frage, inwieweit sie bei der Alkoholwirkung beteiligt sein kann, müssen die wesentlichen Stoffwechseländerungen an der Leber durch Alkohol betrachtet werden. Neben den unspezifischen Membranwirkungen des Alkohols als amphiphile Substanz, die ihrerseits über Änderungen von Enzymaktivitäten veränderte Ausprägung von Stoffwechselwegen verursachen können, führt der erste Dehydrierungsschritt beim Abbau über die Alkoholdehydrogenase zur massiven Erhöhung der Reduktion des NAD-Systems im Zytoplasma und in der Folge zu den bekannten Änderungen im Stoffwechsel: Beim Fettsäurenstoffwechsel in Hepatozyten (nichthepatische Wirkungen sind nicht aufgeführt) ist eine Zunahme der Fettsäurensynthese (4) und vermehrte Veresterung der Fettsäuren zu Triglyceriden festzustellen, sowie eine Abnahme der Fettsäurenoxidation (5). Auch der Kohlenhydratstoffwechsel zeigt markante Veränderungen (s. 6, s. 7).

Mittelbar müssen die anfallenden Reduktionsäquivalente über die Mitochondrien veratmet werden. Es bleibt die Frage, ob der Alkohol, z.B. über den danach erhöhten Reduktionsgrad der Atmungskette, tendenziell die Suszeptibilität der Mitochondrien für die LPO erhöht, und ob sie der Angelpunkt eines Schädigungsmechanismus durch LPO nach Alkohol sein kann, was von DiLuzio (8) und Comporti et al. (9) vorgeschlagen wurde.

Es sollte untersucht werden, wie sich die mitochondriale LPO von akuten

zu chronischen Alkoholgaben hin verändert, und es sollten die Änderungen relevanter Membranparameter mitverfolgt werden. Dabei muß notgedrungen eine Auseinandersetzung mit bestehenden Schemata des Alkoholabbaus erfolgen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kam es dabei zu einer neuen Gewichtung.

Die gängigen Schemata des Alkoholabbaus seien kurz dargestellt:
Die wenig substratspezifische Alkoholdehydrogenase (ADH: Alkohol-NAD: Oxid.-Reduktase, E.C. 1.1.1.1.) des Zytosols der Leberzelle katalysiert den allergrößten Teil des Abbaus von Alkohol unter Beteiligung des Cofaktors NAD^+:

A. $CH_3CH_2OH + NAD^+ \xrightarrow{ADH} CH_3CHO + NADH + H^+$

Ein weiterer Abbauweg soll über das sogenannte "microsomal ethanol oxidising system" (MEOS) verlaufen (10, 11). Es ist dies ein Prozeß, der das Vorhandensein von NADPH voraussetzt:

B. $CH_3CH_2OH + NADPH + H^+ \xrightarrow{MEOS} CH_3CHO + NADP^+ + 2H_2O$

Es sei angemerkt, daß die Existenz und die Bedeutung dieses Stoffwechselwegs umstritten ist (12,13,14)!
Darüberhinaus gibt es zumindestens bei Ratten einen Abbauweg geringerer Bedeutung, der an H_2O_2 und Katalase (E.C. 1.11.1.6.) gebunden ist (15):

C. $CH_3CH_2OH + H_2O_2 \xrightarrow{Katalase} CH_3CHO + 2H_2O$

Katalase ist ubiquitär vorhanden. Das erforderliche H_2O_2 stammt entweder aus der Aktivität einer mischfunktionellen Oxidase:

$$NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow NADP^+ + H_2O_2$$

oder aus anderen H_2O_2 bildenden enzymatischen Reaktionen, wie z.B. aus der Xanthin-Oxidase-Reaktion.
Da die spezifische Aktivität der ADH bei Alkoholikern mit einer Fettleber auf weniger als die Hälfte absinkt (16,17,18,19), liegt die Vermutung nahe, daß der Abbauweg nach A an Bedeutung verliert. Die bei chronischem Alkoholgenuß festgestellte erhöhte Abbaurate von Alkohol (20,21) wird einer überkompensatorischen Aktivitätszunahme des MEOS nach Reaktion B zugeschrieben. Andere Autoren bestreiten dies (14)!

Da man heute davon ausgeht, daß die Reoxidation des NADH der begrenzende Schritt ist, könnte auch eine beschleunigte Oxidation über die mitochondriale Atmungskette vorliegen. Der damit verbundene erhöhte Sauerstoffbedarf ist nachgewiesen (6), wobei allerdings unklar ist, wieviel der theoretisch gewinnbaren Energie bei Oxidation des NADH in der Atmungskette tatsächlich zu ATP-Bildung führen kann und wieviel als Wärme dissipiert (s. 22).

Höherer O_2-Bedarf, wie er nach chronischen Alkoholgaben auftritt (6), führt zwangsläufig zu niedrigeren O_2-Konzentrationen im Gewebe. Ein steiler periportaler - zentrolobulärer O_2-Gradient wird schon bei normoxischer O_2-Versorgung in der Leber beobachtet (23). Zwar ist bekannt, daß erhöhte O_2-Konzentrationen die LPO vermehren, die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, daß gerade bei stark erniedrigten O_2-Konzentrationen der O_2-Verbrauch über die LPO anteilig außerordentlich verstärkt wird.

Die Schutzmechanismen (GSH, Transhydrogenasereaktion, Vitamin E als Antioxidant) besonders soweit sie energieabhängig sind, werden - auch bei Fehlen von wichtigen Nahrungsbestandteilen - überstrapaziert, und es resultiert eine irreversible Schädigung (Zirrhose).

Veränderungen von Mitochondrien nach chronischen Alkoholgaben wurden schon früh beobachtet. Dazu gehören größere "Fragilität" der Mitochondrienmembran (24), Schwellung in situ, Ausbildung von Megamitochondrien, zunächst als Mallorykörper bezeichnet (25), und auch Abnahme der Atmungskontrolle isolierter Mitochondrien (s. 4.2.1.). Die Beteiligung der LPO blieb fraglich, wenn auch dienkonjugierte Lipide als Ausdruck einer peroxidativen Veränderung von Fettsäuren festgestellt wurden (26,27,28). Eine Korrelation mit dem Atmungszustand erfolgte nicht. Dieser Versuch soll im folgenden gemacht werden, wobei auch niedrigen O_2-Drucken Beachtung geschenkt wird.

Die auftretenden adaptativen Veränderungen nach chronischen Alkoholgaben sollen korreliert werden, wobei insbesonders Veränderungen hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber LPO (ausgelöst durch exogene Zugabe von Fe^{2+}/ADP) beachtet werden.

In der Diskussion wird versucht die Vielfalt singulärer neuer Erkenntnisse zu einem neuen Modell der Alkoholwirkung zusammenzustellen. Dieses weicht von herkömmlichen Modellvorstellungen stark ab, da es ohne das MEOS auskommt, den niedrigen O_2-Druck an kritischen Abbauorten der Leber berücksichtigt, den verminderten Kopplungsgrad der Mitochondrien erklärt und die Kalorigenität des Alkohols erkennen läßt. Eine

Schlüsselstellung nimmt das Cytochrom c ein.

Leider treten die beim Menschen beobachteten irreversiblen Schädigungen bei dem hier benutzten Versuchstier, der Ratte, gemeinhin nicht auf (29), wenn auch die reversiblen Adaptationsmechanismen sicherlich zuverlässig untersucht werden können.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, in Ratten durch Manipulation der Nahrung klinische Krankheitsbilder wie beim Menschen zu erzeugen (s.30). Dabei ging es vor allen Dingen darum, den Ratten genügend Alkohol zu verabreichen (kalorienmäßig vergleichbar der Menge, die der Mensch zu sich nimmt).

Da bei der in der Literatur sehr unterschiedlich gehandhabten Fütterung eine genaue Kontrolle der Stoffwechsellage unmöglich ist, leidet darunter natürlich die Vergleichbarkeit der veröffentlichten Ergebnisse. Unter diesem Vorbehalt sind auch hier nur die mit dem gleichen Fütterungsmodus gemachten Versuche als in sich konsistent zu betrachten.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Wistar-Ratten. Diese waren einmaligeNachzüchtungen mit Muttertieren der Fa. Ivanovas, Kislegg.

2.1.2. Tierfütterung

Das Festfutter wurde von der Firma Altromin, Lage, in pelletierter Form bezogen. Normalerweise wurden die Ratten mit Altromin^{R} und Leitungswasser ad libitum ernährt. Ratten, die im diätären Fütterungsversuch verwendet wurden, erhielten zunächst bis zu einem Körpergewicht von 50g das obige Grundfutter und wurden dann mit Diät auf ein Körpergewicht von 100g gebracht, bevor sie chronisch Alkohol erhielten.
Die diätäre Nahrung bestand aus einer Standarddiät als Kontrolldiät (C 1000 von Altromin; Fettanteil 3% raffiniertes Sojaöl) oder aus der gleichen Diät C 1000, bei der der Sojaölanteil vollständig durch Palmin (Palmindiät) ersetzt wurde (Fettsäurenzusammensetzung s. Anhang). Der diätäre Versuch wurde von Mitte Juni bis Ende Juli durchgeführt. Bei chronischer Alkoholgabe wurde den Ratten eine alkoholische Trinkwasserlösung ad libitum angeboten (20% EtOH (w/v)). Diese war aus Gründen der besseren Genießbarkeit mit Saccharin (0,25g/l Lösung). gesüßt. Als Kontrolle wurde jeweils eine 26,9% Saccharoselösung (w/v) ad libitum verfüttert.
Die Ratten wurden frühestens drei Wochen nach Beginn der Alkoholverfütterung durch Genickschlag getötet, der Bauchraum eröffnet und die Leber entnommen.

2.1.3. Chemikalien, Enzyme und Coenzyme

Radioaktive Substanzen: ^{45}Ca-$CaCl_2$ (5mCi/ml), $^{3}H_2O$ (250µCi/ml) und ^{14}C-Inulin (2,3µCi/mg) wurden von NEN Chemicals, Dreieich, und ^{86} Rb-RbCl (10µCi/mg) von der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig, gekauft.
Szintillationsflüssigkeit: Es wurde Unisolve 100 von Koch-Light Laboratories Ltd (Lieferant Fa. Zinser, Frankfurt) verwendet.
Silikonöle: Für die Silikonzentrifugation wurden die Typen AR 20 und AR 200 der Fa. Wacker Chemie, München, verwendet. Diese wurden

im Verhältnis 1:15,3 gemischt.
Gase und Substanzen für Sauerstoffdruckexperimente und Gaschromatographie: Zur Darstellung der synthetischen N_2/O_2-Gemische für die LPO unter niedrigem O_2-Druck dienten N_2 und O_2 der Reinheit 99,99%. Für die Gaschromatographie wurde für N_2 und H_2 die Reinheit 99,999% benutzt. Alle Gase stammten von der Fa. Messer Griesheim.
Von Sigma, München, waren die Eichlösung für die Fettsäurenbestimmung und Bortrifluorid (14% BF_3 in Methanol) zur Veresterung der Fettsäuren.
Tetramethylphenylendiamin (TMPD), (+) Catechin-Hydrat und 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion (Luminol) wurden von der Fluka AG, Neu Ulm, bezogen.
Von Serva, Heidelberg, wurden N-Morpholino-3-propan-sulfonsäure (MOPS), Valinomycin, Heparin und 2,4-Dinitro-kresol gekauft.
Das verwendete Amitryptilin war von Prof. Dr. U. Breyer-Pfaff, Tübingen; 4-Hydroxybenzyliden-malondinitril war von Dr. R. Jones, Heidelberg, und p-Trifluormethoxy-carbonylcyanid-phenylhydrazon (FCCP) von Prof. Palmieri, Bari.
Alle übrigen Biochemikalien wurden bei der Fa. Boehringer, Mannheim, gekauft.
Alkohol, p.a. und sonstige Reagenzien waren von der Fa. E. Merck, Darmstadt.

2.1.4. Geräte

Zum Zentrifugieren wurden benutzt: eine Beckmann J 21B mit dem Rotor JA 20 (Mitochondrienisolierung), eine Hettich AHT 5200 oder Eppendorf Tischzentrifuge (Thiobarbitursäurereaktion) und eine Mikrofuge 152 (Fa. Beckman, München) für die Silikonzentrifugation.

Optische Meßgeräte: Für die Bestimmung der Reaktion mit Thiobarbitursäure diente ein Eppendorf- oder Zeissphotometer (PM QII). Das Zeiss-Photometer mit Flammenionisationseinrichtung wurde auch für die Bestimmung des mitochondrialen Kaliums benutzt.
Die Bestimmung des Cytochrom c erfolgte mit einem Double Wavelenghth Aminco-Chance Spektrophotometer. Ein Atomabsorptionsspektrophotometer (Beckman 1233) diente zur Bestimmung von intramitochondrialem Calcium.

Für die Messung der Protonenpermeabilität wurde eine Glaselektrode mit Knick-pH-Meter und einer zwischengeschalteten Spannungsquelle zur Nullpunktsunterdrückung benutzt, so daß eine Empfindlichkeitssteigerung bei einem noch vertretbaren Signal-Rausch-Verhalten erreicht wurde, bei der ein Schreiberausschlag von 1 cm einer Menge von 10 nMol H^+ entsprach (5 mV Eingangsspannung).

Die Sauerstoffbestimmungen erfolgten mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark (Eigenbau des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Marburg) mit angeschlossener Verstärker- und Schreibereinrichtung. Die Polarisationsspannung betrug 0,6V. Die Messungen wurden in einem auf 30°C thermostatisierten Meßgefäß von 1 ml Inhalt durchgeführt. Ein kleiner Magnetrührer sorgte für schnelle und vollständige Durchmischung.

Die polarographischen Bestimmungen wurden mit einem AMEL 471-Multipolarographen als Gleichstrom-Peak-Voltametrie und einer synchronisierten tropfenden Hg-Elektrode durchgeführt. Gemessen wurde gegen eine gesättigte Kalomel-Elektrode. Die gemessenen Potentiale wurden auf die Wasserstoffelektrode mit dem pH 7 umgerechnet (E_o: hier 20°C, pH 7).

Die Initialradikalbildung wurde mit dem Luminometer 1250 von LKB bestimmt, das leihweise von der Fa. LKB, Gräfelfing, zur Verfügung gestellt wurde.

Alle Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Szintillationszähler (BF 5001) der Fa. Berthold, Wildbach, mit einem angeschlossenen Algotronic-Tischrechner (Fa. Diehl) durchgeführt.

Die Gaschromatographie wurde mit Geräten der Fa. Carlo-Erba, Mailand, vorgenommen. Die Kohlenwasserstoffbestimmungen erfolgten auf einer Porasil C Kieselgelsäule, isothermal bei 60° C mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Die erhaltenen Diagramme wurden graphisch ausgewertet.

Die Fettsäurenbestimmungen erfolgten auf einer Glas-Kapillar-Säule mit Polyäthylenglycol, verestert mit Terephthalsäure als stationärer Phase. Es wurde folgendes Temperaturprogramm benutzt: Beginn bei 130° C, Heizrate 2° C/min bis auf 200° C und Verbleib für 25 min. Die Auswertung geschah mit einem Integrator von Spectraphysics, Santa Clara, Kalifornien.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von Mitochondrien

Rattenlebermitochondrien wurden nach Klingenberg et al. (31) isoliert: Genau standardisiert wurden methodisches Vorgehen und Zeitdauer der Präparation. Die Mitochondrien von Kontrollratten und von Ratten nach chronischen Alkoholgaben wurden parallel isoliert, um die Vergleichbarkeit der Meßergebnisse zu verbessern.

Nach Entnahme wurde die Leber in kaltem Leitungswasser gewaschen und in das eisgekühlte Isolationsmedium (IM) (0,25M Saccharose, 0,001 M Äthylenglycol-bis(ß-aminoäthyläther) N,N -tetraessigsäure (EGTA, Na-Salz), 0,01M Trihydroxymethylaminomethan (Tris/HCl), pH 7,2, gelegt. Je 6,5g jeder Rattenleber wurden nach Kühlung auf 0° C in 40ml IM geschnitten und anschließend bei 150 Umdrehungen/min (Upm) homogenisiert (nur einmalige Homogenisation). Das Homogenat wurde in gekühlte Zentrifugenbecher überführt und in der Beckmann-Zentrifuge bei 0° C zentrifugiert. Bei der ersten langsamen Zentrifugation wurde der Rotor zunächst auf 5000 Upm beschleunigt und dann sofort auf 2000 Upm (≙ 400g) zurückgestellt. Die Gesamtdauer der 1. Zentrifugation betrug 8 min. Der Überstand wurde dekantiert und rezentrifugiert, wobei zuerst auf 11000 Upm beschleunigt und dann bei 8000 Upm (≙4000g) für insgesamt 8min zentrifugiert wurde. Mit saugfähigem Papier wurde die oben schwimmende Fettschicht sorgfältig entfernt und der verbleibende Überstand verworfen. Nach Resuspendierung des mitochondrialen Sediments in 5 ml KCl- (0,15M) oder Saccharoselösung (0,25M) wurde erneut 5 min, wie bei der 2. Zentrifugation, abzentrifugiert. Danach wurde erneut resuspendiert und zentrifugiert. Nach dem letzten Waschgang wurde das mitochondriale Sediment in 0,5ml KCl- (s.o.) oder Saccharoselösung (s.o.) suspendiert und unter Verschluß bei 0° C aufbewahrt.

2.2.2. Inkubationen unter normalem Sauerstoffdruck

2.2.2.1. Inkubationen für die Induktion der LPO

Die LPO wurde exogen durch Zusatz von Fe^{2+} -Ionen und ADP ausgelöst. Die Inkubationsbedingungen waren wie folgt:

Variante A: In 25ml Erlenmeyerkölbchen wurden 3ml Basismedium (BM: 0,15M KCl, 0,002M $MgCl_2$, 0,01 M Tris/HCl, 0,0015M KH_2PO_4), pH 7,2, überführt, wobei dem BM alle Reagenzien (s. bei den entsprechenden Abbildungen und Tabellen) zugesetzt waren. Die Thermostatisierung bei 30° C erfolgte im Wasserbad einer Schüttelmaschine bei langsamer Bewegung. Die Inkubation wurde durch Zugabe von Mitochondrien der KCl-Suspension gestartet. Nach

30min (oder zusätzlichen Zeitintervallen für die Kinetik) wurden Aliquote entnommen und in 35% TCA eingespritzt (Aufarbeitung s. 2.2.4.3.).

Variante B: Die Inkubation erfolgte in 1ml BM in gekürzten Reagenzgläsern. Für die Äquilibrierung wurde mit einem Magnetrührer gerührt. Die anderen Bedingungen entsprachen denen der Variante A, mit Ausnahme der Inkubationszeit, die auf 7min beschränkt wurde. Zudem wurde nach 3min bei Status 3-Atmung nochmals KH_2PO_4 zugesetzt (Endkonzentration 0,0015 M). Für die Kohlenwasserstoffbestimmung wurde 1ml des Inkubats nach Variante A in 5ml Ampullen überführt, die sofort zugeschmolzen wurden. Dreißig min lang wurde bei 22° C in einer Wendemaschine inkubiert, wobei die Durchmischung durch eine dem Inkubat beigefügte Glaskugel sichergestellt wurde. Die Reaktion wurde beendet durch rasches Einfrieren in einer Trockeneis/Methanol-Mischung und Lagerung bei -80° C.

2.2.2.2. Messung der Initialradikalbildung

Variante A: Das Lumanol-Reagenz (beschrieben in LUMAC Preliminary Application 602, Abimed, Düsseldorf) wurde auf folgende Weise hergestellt: 0,1ml einer 1mM Lösung von Luminol in NaOH, pH 12, wurden mit 4,9ml Glycinpuffer (0,1M, pH 10,5) gemischt. Danach wurde eine 10mM Lösung aus Kalium-hexacyanoferrat (III) in Glycinpuffer hergestellt und 1ml dieser Lösung mit 4ml der Luminol-Glycinpuffer-Lösung zum Lumanol-Reagenz gemischt. Dieses wurde im Dunkeln bei 4° C aufbewahrt. Zwei ml BM (pH verändert auf 8,5) wurden mit Mitochondrien (KCl-Suspension) versetzt und in das Meßgerät gestellt. Die Meßkammer wurde geschlossen und die Basislinie aufgezeichnet. Der Start der Reaktion erfolgte mit Zugabe von 100µl des Lumanol-Reagenzes ohne Öffnen der Meßkammer. Die Abklingreaktion der Chemilumineszenz wurde beobachtet. Nach Ereichen einer Konstanz konnten der mitochondrialen Suspension weitere Substanzen zugesetzt werden, ohne daß die Meßkammer geöffnet werden mußte.

Variante B: Nach dieser Methode wird eine 1mM Luminollösung verwendet. Auch hier war das pH des BM 8,5 (Luminol war schon zugesetzt). Der Start erfolgte durch Mitochondrienzugabe. Die Meßkammer blieb dabei geschlossen. Wiederum wurde die Abklingreaktion der Chemilumineszenz beobachtet. In allen Fällen wurde auf der höchsten Empfindlichkeitsstufe des Luminometers gemessen. Diesem war ein Bausch & Lomb-Schreiber angeschlossen, der bei einer Eingangsspannung von 0,5mV ein noch vertretbares Signal-Rausch-Verhalten zeigte.

2.2.2.3. Calciumaufnahme und -wiederabgabe
Bestimmt wurde das intramitochondriale Calcium nach Inkubation von Mitochondrien (Saccharosesuspension) mit ^{45}Ca-$CaCl_2$ (zugesetzte Mengen s. Abb. 18 und 19). Das Inkubat wurde im Wasserbad auf 30° C thermostatisiert und gut gerührt, um ausreichende O_2-Versorgung zu gewährleisten. (Die O_2-Konzentration sank nie unter 1/3 der Sättigungskonzentration.) Mittels Silikonzentrifugation (32) wurde aus dem mit 3M KOH enteiweißten mitochondrialen Sediment das intramitochondriale Calcium bestimmt. Die gewonnenen Werte wurden noch um das Calcium aus dem mit ^{14}C-Inulin bestimmten extramitochondrialen (mitgerissenen) Wasser korrigiert.

2.2.2.4. Bestimmung des Membranpotentials
Das Membranpotential (MP) wurde über die Verteilung von ^{86}Rb (im wesentlichen nach 2.2.2.3.) bestimmt. Rb^+ verteilt sich in Gegenwart von Valinomycin passiv nach dem elektrochemischen Gradienten (33). Aus der Nernstschen Gleichung kann dann aus extramitochondrialer Rb-Konzentration $(Rb)_a$ und der durch Silikonzentrifugation bestimmten intramitochondrialen Rb-Konzentration $(Rb)_i$ das MP berechnet werden:

$$E = \frac{RT}{1 \cdot F} \cdot \ln \frac{(Rb)_a}{(Rb)_i}$$

(Zur Berechnung von $(Rb)_i$ wurde das gesamte Lösungsvolumen im Sediment mit ^3H_2O, der mitgerissene Mediumanteil mit ^{14}C-Inulin bestimmt).

2.2.2.5. Messung von Kaliumaufnahme und -wiederabgabe. Die Inkubation der mitochondrialen Suspension (in Saccharoselösung) und die Silikonzentrifugation waren entsprechend 2.2.2.3..

2.2.2.6. Messung der Normalpotentiale von Entkopplern
Die Messung erfolgte im BM als Elektrolyten gegen eine gesättigte Kalomelelektrode. Alle Entkoppler wurden als 1mM Lösungen in Äthanol gelöst. Begast wurde mit 3-Ring-Stickstoff. Es wurde eine anodische Oxidation von -1,8 bis +0,1 V und eine kathodische Reduktion von 0 bis -2 V durchgeführt.

2.2.3. Inkubation unter verringertem Sauerstoff-Druck

Alle benutzten Medien und die H_2O - Sperrflüssigkeit wurden vor Gebrauch mit N_2 begast und unter N_2 aufbewahrt. Auch das Ausgleichsgefäß und das Mischgefäß wurden mit N_2 gespült.

Ein Reagenzglas (11ml Volumen) mit Schliff wurde mit N_2begast, wobei die Öffnung mit dem zugeschmolzenen Schliff eines Reduzierstückes so weit abgedeckt wurde, daß nur noch die Kanüle des Begasungsschlauches hindurch-ging (Abb. 1). Parallel dazu wurde die tatsächliche O_2-Konzentration an einer O_2-Elektrode mit einem Servogorschreiber bei 2mV Vollausschlag gemessen. Ein Schreiberausschlag von 1 cm entsprach einer Änderung der O_2-Menge um 0,52nMol O_2 bei 2mV Eingangsspannung. In das Reagenzglas

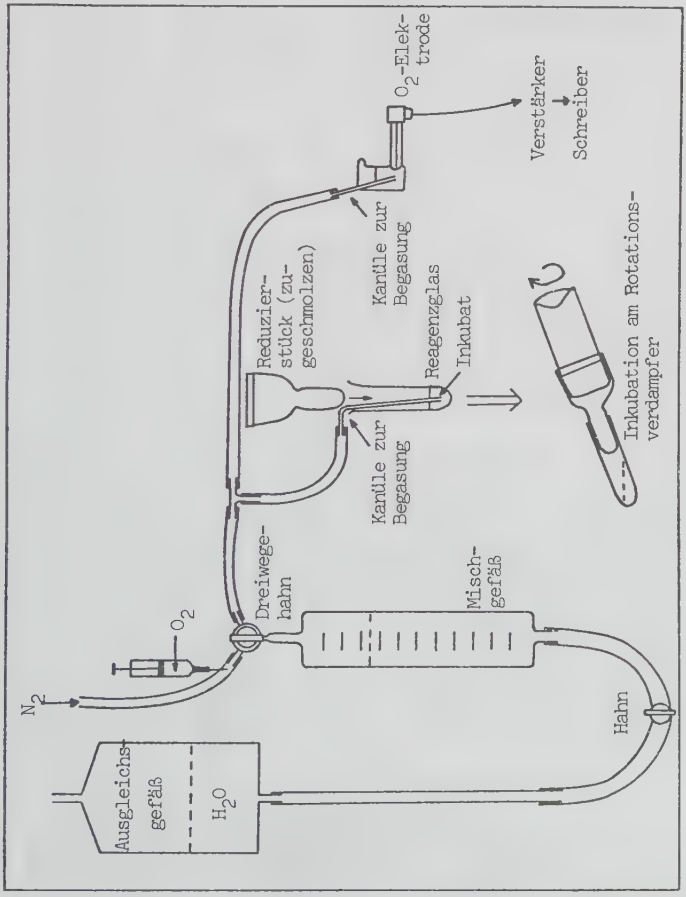


Abb. 1: Schemati-sierte Darstellung der Inkubation mitochondrialer Suspensionen unter verringertem O_2 Druck. Beschreibung s. Text.

wurde 1ml BM (versehen mit Succinat) vorsichtig eingefüllt. Nach ungefährer Nullwerteinstellung durch Begasung des BM mit N_2 wurden 1,5mg mitochondriales Protein hinzugefügt. Die mitochondriale Suspension wurde entweder mit N_2 oder mit den im Mischgefäß hergestellten synthetischen N_2/O_2-Gemischen begast. Nach 5 min - das entsprach der Zeit, die nötig war,

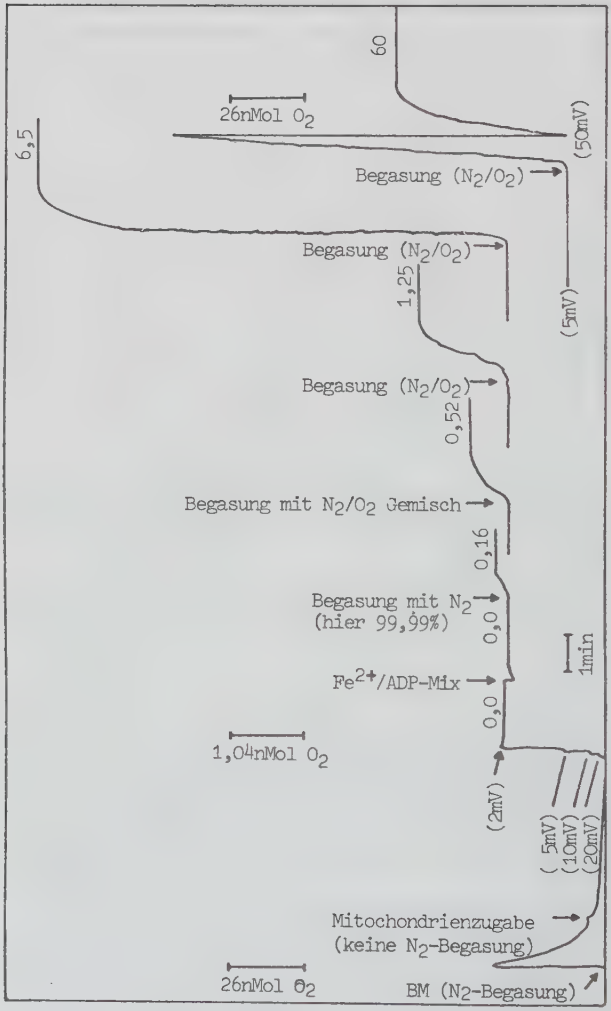


Abb. 2: Graphische Darstellung der Sauerstoffmengen in der Gasphase der mitochondrialen Inkubationen unter verringertem O_2-Druck.
Angaben innerhalb der Klammer in (mV) beziehen sich auf die gewählten Eingangsspannungen des Schreibers. Die Werte ohne Dimensionsangaben geben die gemessenen O_2-Mengen in (nMol O_2/ml) Gasraum an. Die obigen Graphen sind repräsentativ; die zur Rechnung benutzten Werte sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

um nach Mitochondrienzugabe ohne N_2-Begasung Anaerobiose zu erreichen (s. Abb. 2) - wurde die LPO durch Zugabe einer Mischung aus Fe^{2+}-Ionen und ADP gestartet. Das Reagenzglas wurde jetzt mit dem Reduzierstück verschlossen und an einem Rotationsverdampfer in maximaler Schräglage (zum besseren Gasaustausch zwischen mitochondrialer und Gasphase) langsam rotiert. Die Reaktion wurde nach 7min mit dem schnellen Einspritzen von 100µl 5M TCA gestoppt. Dazu wird das Reduzierstück vorsichtig so weit angehoben, bis eine Kanüle in die Öffnung des Reagenzglases geschoben werden kann.

Die in Abbildung 2 angegebenen O_2-Mengen, die nach Begasung mit den N_2/O_2-Gemischen gemessen wurden, entsprechen denen in der Gasphase der Inkubationen. Die Werte für die wäßrige mitochondriale Phase müssen mit Hilfe des Bunsenschen Absorptionskoeffizienten berechnet werden.

2.2.4. Analytische Methoden

2.2.4.1. Bestimmung des Atmungskontrollquotienten (ACR)

Der ACR wurde nach Estabrook (34) wie folgt bestimmt:
Luftgesättigtes BM wurde in das Meßgefäß gefüllt, das dann verschlossen wurde. Nach Erreichen eines konstanten Stromes wurde der Schreiber geeicht. (Die Eigen"atmung" der Elektrode betrug maximal 2,6 nMol O_2/min und wurde bei den Messungen berücksichtigt). Für die Bestimmung der absoluten Atmungsraten wurde für 30°C eine Sauerstoffmenge von 240 nMol O_2/ml (240µM) zugrunde gelegt.

Nach Eichung wurde die mitochondriale Suspension mit 1-2,5mg Protein/ml zugegeben, wobei auf quantitative Überführung der Mitochondrien geachtet wurde. Dies kann durch mehrmaliges Ansaugen und Ausstoßen von etwas BM aus der Pipettenspitze geschehen, ohne daß dabei Luft in die Suspension "gepumpt" wird. Nach kurzer Zeit stellte sich die Basisatmung der Mitochondrien ein. Nach 1min wurde ein Substrat in die Suspension gegeben, so daß sich die Status 4-Atmung einstellte. Nach einer weiteren Minute wurden etwa 150nMole ADP zugesetzt und damit die Status 3-Atmung eingestellt, die nach Verbrauch des ADP in den Status 4 zurückfiel. Nach Erreichen einer konstanten Atmungsrate wurde die Messung beendet. Der ACR wurde berechnet aus (35):

$$ACR = \frac{\text{Atmungsrate im Status 3}}{\text{Atmungsrate im Status 4 nach Verbrauch von ADP}}$$

2.2.4.2. Darstellung von Malondialdehyd

1mM 1,1,3,3-Tetraäthoxypropan (TEP) wurde mit 0,1M HCl auf 0,2mM verdünnt. Es folgte Hydrolyse im siedenden Wasserbad für 20min und anschließende Neutralisation des Hydrolysates mit 1M NaOH. Die Hydrolyse verlief zu etwa 40%. Die exakte freigesetzte MDA-Menge wurde mit Thiobarbitursäure (TBA) bestimmt.

2.2.4.3. Die Thiobarbitursäurereaktion

Die sogenannte Thiobarbitursäurereaktion dient zum Nachweis von Malondialdehyd (MDA) als einem wichtigen Zerfallsprodukt des peroxidativen Abbaus von ungesättigten Fettsäuren (36,37). Der Mechanismus ist ungeklärt, und aufgrund der bloßen Annahme einer gleich starken Oxidation aller in Frage kommenden Fettsäuren (38), spricht man allgemein besser von "Thiobarbitursäurepositivem" Material. Dieses setzt sich mit Thiobarbitursäure (TBA) zu einem Farbkomplex unbekannter Natur um und kann dann photometrisch bestimmt werden.

Dazu wurde das enteiweißte Aliquot mit 1% neutralisierter TBA-Lösung versetzt (Verhältnis 1:1) und 10min im siedenden Wasserbad oder im Metallblock von 95^{o}C erhitzt. Erst danach wurde das Protein abzentrifugiert (Abzentrifugation des Proteins vor Farbstoffbildung führt zu einem Verlust von etwa 10%). Gemessen wurde bei 535nm bzw. 546nm Wellenlänge. Für die Umrechnung auf das Absorptionsmaximum des Farbstoffkomplexes bei 535nm wurde der Faktor 1,98 benutzt (errechnet als Quotient der molaren Extinktionskoeffizienten).

2.2.4.4. Aufarbeitungsmethode für die Fettsäurenanalyse

Extraktion der Lipide aus Mitochondrien (modifiziert von Dr. Frank nach Folch et al. (39)):

In 50ml Schliffzentrifugengläser wurden 10µl interne Standardlösung (80µg Heptadecansäure/10µl Methanol), 0,5ml Mitochondriensuspension mit 0,75mg Protein und 3,3ml Methanol pipettiert. Unter Abschluß wurde 5min lang kräftig gerührt (Magnetrührer). Es wurden 3,3ml Chloroform (versetzt mit 0,001% 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) als Antioxidant)hinzupipettiert und wieder 5min gerührt. Dies wurde mit weiteren 3,3ml Chloroform wiederholt. Nach Extraktion wurde das Protein durch 15minütige Zentrifugation abgetrennt. Es wurden 600µl entnommen und in ein Reactivial

(Macherey-Nagel, Düren) überführt. Das Lösungsmittel wurde im N_2-Strom abgeblasen. Dieses wurde mit weiteren 600µl wiederholt.

Verseifung der Lipide und Veresterung der Fettsäuren (modifiziert nach Metcalfe und Schmitz (40)): Die Lipide wurden im Reactivial in 50µl 0,5M NaOH/Methanol aufgenommen und bei 100°C für 5min unter Stickstoff verseift. Nach Abkühlenlassen wurden 50µl BF_3/Methanol zur Veresterung hinzugegeben. Wiederum wurde 5min auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wurden 200µl Petroläther (40–60°C) und 300µl halbgesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt. Das Reactivial wurde 2min geschüttelt. Nach Trennung der Phasen wurde die Oberphase mit einer 250µl Spritze in ein weiteres Reactivial überführt. Der Petroläther wurde dann im N_2-Strom abgeblasen. Die Ester wurden anschließend in 50µl n-Hexan aufgenommen und davon wurden 0,8µl in Probenkapillaren für die GC-Analyse überführt. Das Lösungsmittel dampfte ab, bevor die Probenkapillaren in den Probenwechsler gelangten.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (41).

Die mitochondrialen Proben für die Fettsäurenbestimmungen wurden in flüssigem N_2 aufbewahrt.

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des t-Testes für den Vergleich zweier Mittelwerte in zweiseitiger Fragestellung durchgeführt. Signifikanzen wurden nach Crow und Gardner bestimmt (42). Die Meßergebnisse werden als Mittelwerte ($\bar{x}$) oder als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm s_x$) angegeben. Unter "p" wird die Wahrscheinlichkeit angegeben (n.s. bedeutet "nicht signifikant"). Die Regressionsgeraden wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet.

Tabellen und Diagramme ohne besonderen Hinweis stellen Meßergebnisse dar, die an Mitochondrien männlicher Tiere gewonnen wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Bestimmung des Atmungskontrollquotienten (ACR)

3.1.1. Abhängigkeit des ACR von der Proteinmenge

Wesentlicher Parameter der Integrität mitochondrialer Membranen ist der ACR (Definition s. 2.2.4.1.). Da bekannt ist, daß dieser außer von membraninhärenten Eigenschaften von der Zusammensetzung des Meßmediums (Basismedium: BM), der Art der Präparation und dem Alter der Mitochondrien nach der Isolierung abhängig ist, wurden bei Messung des ACR strengste Kriterien angelegt, hinsichtlich der Standardisierung von Präparation, des Zeitfaktors und des pH des BM.

Es zeigte sich aber, daß darüber hinaus eine nicht erwartete Abhängigkeit des ACR von der in der Messung eingesetzten Proteinmenge festzustellen war (Tab. 1).

Protein (mg/ml)	ACR_{Succ}	N	p	$ACR_{ß\text{-}HOB}$	N	p
3,4±0,6	3,0±0,4	6		3,5±1,7	4	
1,6±0,2	4,2±0,5	9	< 0,001	4,0±0,4	5	n.s.
0,2±0,03	3,2±1,2	5	< 0,05	2,3±1,3	3	< 0,05

Tab. 1: Abhängigkeit des Atmungskontrollquotienten von der Proteinmenge für die Substrate Succinat (Succ) und ß-Hydroxybutyrat (ßHOB)

Aus diesem Grunde wurde bei Messungen des ACR immer eine mittlere Proteinmenge von 1-2,5mg/ml BM eingesetzt, da hier die größten Werte für den ACR zu erwarten waren und weil angenommen wurde, daß dann die Änderungen des ACR nach exogener Beeinflussung (Alkoholgaben, Diät) am deutlichsten in Erscheinung treten würden.

3.1.2. Der ACR nach chronischen Alkoholgaben

3.1.2.1. ACR bei männlichen Ratten, gefüttert mit Standard- oder Palmindiät

Der Vergleich der ACR in Tabelle 2 zeigt deutlich eine Abnahme der gemessenen Werte nach chronischer Alkoholvorbehandlung. Dies gilt für die

gewählten Substrate (Succinat (Succ) liefert Reduktionsäquivalente am Site II in die mitochondriale Atmungskette, ß-Hydroxybutyrat (ßHOB) am Site I) und für die Verfütterung einer Palmindiät, statt der sonst üblichen Standarddiät.

	Kontrolle		chronisch EtOH	
	Succ	ßHOB	Succ	ßHOB
Standarddiät	$4,7\pm0,4^{a}$ (39)	$5,3\pm1,1^{b}$ (39)	$3,6\pm0,2^{c}$ (38)	$3,7\pm0,3^{d}$ (38)
Palmindiät	$3,1\pm0,3^{e}$ (6)	$3,2\pm1,0^{f}$ (6)	$2,6\pm0,4^{g}$ (4)	$3,1\pm0,3^{h}$ (4)

ac : $p < 0,001$
bd : $p < 0,001$
eg : $p < 0,05$
fh : n.s.
ae : $p < 0,001$
bf : $p < 0,001$

Tab. 2: Die Abhängigkeit des ACR von chronischen Alkoholgaben und der Diät bei männlichen Ratten
Klammerausdrücke geben die Anzahl der untersuchten Ratten an.

Auch die Palmindiät selbst ruft schon eine gleichsinnig gerichtete Verringerung des ACR unter den Kontrollbedingungen (Saccharoseverfütterung) hervor (Vergleich von ae und bf), wie chronische Alkoholgaben mit demselben Fütterungsmodus (Vergleich ac und bd). Bei einer Palmindiät führen chronische Alkoholgaben darüberhinaus zu einer weiteren, wenn auch kleineren, Verringerung des ACR (Vergleich eg und fh).

Die Beobachtung, daß männliche Ratten, die zusammen mit einer Palmindiät chronischen Alkoholgaben ausgesetzt waren, innerhalb von zwei Wochen nach Fütterungsbeginn zu 50% starben, und die restlichen Ratten einen außerordentlich niedrigen ACR zeigten (s."g"in Tab. 2) deutet auf einen Grenzwert für den ACR hin, der ohne Gefahr für die Ratte nicht mehr unterschritten werden darf.

Bemerkt sei noch, daß der ACR für ßHOB bei den Kontrollen außerordentlich schwankte, wie man aus der Standardabweichung ersehen kann. Die Ur-

sache dafür ist nicht bekannt.

3.1.2.2. ACR bei weiblichen Ratten, gefüttert mit Standard- oder Palmindiät

Lebermitochondrien weiblicher Ratten zeigen hinsichtlich des ACR ein ähnliches Verhalten wie die männlicher: der ACR fällt nach chronischen Alkoholgaben ab, allerdings ist dies nur deutlich erkennbar bei Succinatveratmung, nicht dagegen bei ßHOB (Tab. 3).

	Kontrolle		chronisch EtOH	
	Succ	ßHOB	Succ	ßHOB
Standarddiät	$4,1\pm0,5^{a'}$ (49)	$4,2\pm0,5^{b'}$ (49)	$3,6\pm0,5^{c'}$ (18)	$4,4\pm0,3^{d'}$ (18)
Palmindiät	$3,2\pm0,6^{e'}$ (6)	$4,2\pm0,6^{f'}$ (6)	$2,8\pm0,4^{g'}$ (5)	$4,2\pm0,6^{h'}$ (5)

aa' : $p < 0,001$
bb' : $p < 0,001$
a'c' : $p < 0,001$
b'd' : n.s.
a'e' : n.s.
b'f' : n.s.

Tab. 3: Die Abhängigkeit des ACR von chronischen Alkoholgaben und der Diät bei weiblichen Ratten
Klammerausdrücke geben die Anzahl der untersuchten Ratten an.

Die Verfütterung von Palmin führt bei weiblichen Ratten nicht zu einer solch drastischen Erniedrigung des ACR wie bei männlichen Ratten (Vergleich ae und a'e' bzw. bf und b'f') wenn Saccharose verfüttert wird. (Die Werte nach Fütterung von Alkohol unterscheiden sich sowieso nicht sehr stark voneinander!)
Dies liegt daran, daß Mitochondrien von weiblichen Ratten der Kontrolle signifikant verringerte ACR aufweisen im Vergleich zu Mitochondrien von männlichen Ratten (Vergleich aa' und bb') unter sonst gleichen Bedingungen. Da der ACR ein Maß für den energetischen Kopplungsgrad der Mitochondrien

ist, kann man aus dem obigen Befund auf eine verringerte Kopplung bei weiblichen Mitochondrien schließen, was einer erhöhten endogenen Atmung entspricht (s. Theoretischer Teil). Dies steht im scheinbaren Widerspruch zum erhöhten Grundumsatz bei männlichen Tieren. Es wird hier allerdings nicht der Gesamtorganismus betrachtet, so daß z.B. die beim männlichen Geschlecht stark vermehrte Muskelmasse nicht zum Tragen kommt.

3.2. Messung der Lipidperoxidation (LPO)

3.2.1. LPO unter normalem Sauerstoffdruck

3.2.1.1. Veratmung von Malondialdehyd (MDA)

In den folgenden Abschnitten soll die LPO quantitativ mit Hilfe des Malondialdehyds (MDA) bestimmt werden. Nach Placer et al. (43), Holtkamp und Hill (44), Recknagel und Goshal (45) u.a. veratmen Leberhomogenate MDA, da sie Aldehyddehydrogenasen relativ unspezifischer Natur enthalten (46). Dies gilt auch für isolierte Mitochondrien (47), wenn ihnen als Substrat MDA (dargestellt nach 2.2.4.2.) angeboten wird.
Die Abbildung 3 zeigt in Teil A und B Bedingungen, unter denen MDA abgebaut wird. Dies ist der Fall bei Mitochondrien ohne exogenes Substrat (Basisatmung): Die Kurve (■—■) in B repräsentiert den Abbau von MDA ohne Anwesenheit von Fe^{2+} - Ionen nach Zusatz von etwa 2,3nMol MDA/mg Protein. Die Abbaurate beträgt zu Beginn 0,046nMol MDA/min/mg Protein und verringert sich dann, weil vermutlich die Substratsättigung der Aldehyddehydrogenasen unterschritten wird. Zusatz von Fe^{2+}-Ionen vermindert die Oxidationsrate von MDA, da jetzt die durch Fe^{2+}/ADP induzierte LPO zusätzlich MDA bildet. Die Oxidation beträgt jetzt bezogen auf den Zusatz 0,02nMol MDA/min/mg Protein. Vorausgesetzt, daß der Zusatz von Fe^{2+}-Ionen die mitochondriale Atmung nicht beeinflußt (Atmungsexperimente geben für den angegebenen Konzentrationsbereich keine Hinweise dafür), dann bedeutet das eine durch LPO bedingte Malondialdehydproduktion von 0,026nMol MDA/min/mg Protein.

Wird ßHOB als Substrat angeboten (A:▲—▲), so ändert sich im Vergleich zur Basisatmung in B so lange nichts, wie die Status 4-Atmung bestehen bleibt. Erst eine durch ein ADP-regenerierendes System (Glucose und Hexokinase) ausgelöste Status 3-Atmung führt zu einer Zunahme der MDA-Veratmung. Dies kann erklärt werden mit der nun gesteigerten Atmungskapazi-

tät (A:▲—▲) oder der verringerten LPO im Status 3.

Wird ß-HOB dagegen durch Succinat ersetzt, so ergibt sich, daß jetzt weder im Status 4 noch im Status 3 wesentliche Mengen von zugegebenem MDA veratmet werden: Succinat scheint in der Lage zu sein, die Veratmung von MDA wie die aller kompetitiv angebotenen NADH-spezifischen Substrate zu unterbinden (A: (●—●) und (○—○)).

Auf dieser Tatsache beruhen alle hier gemachten Messungen, bei denen

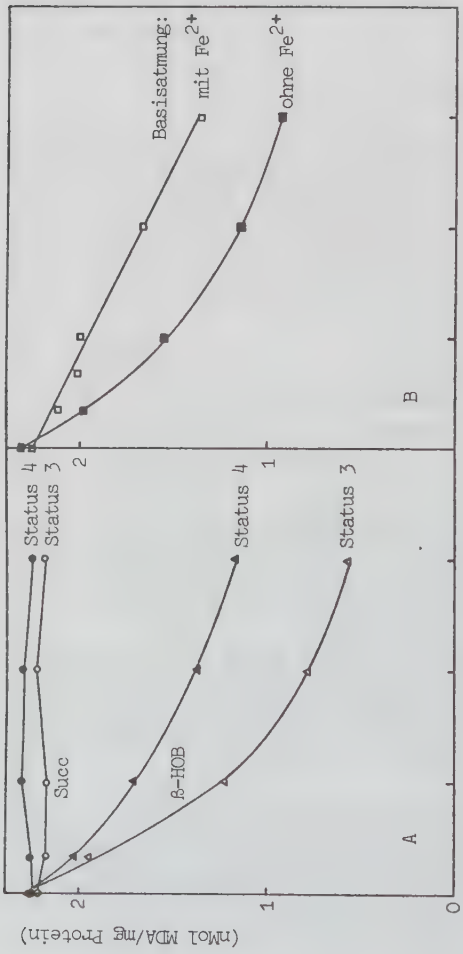


Abb. 3: Veratmung von Malondialdehyd (MDA) durch Rattenlebermitochondrien
Die Inkubationen wurden nach Variante A (s.2.2.2.1.) durchgeführt. Die Anfangskonzentration je Inkubation war 4,43µM an MDA, darüberhinaus für (●—●) 10mM Succ; (○—○) ibid.+ 10mM Glucose, 0,6mM ADP, 2µl Hexokinase (HK); (▲—▲) 10mM ß-HOB; (▲—△) 10mM ß-HOB, 10mM Glucose, 0,6mM ADP, 2µl HK; (■—■) 0,6mM ADP; (□—□) 0,6mM ADP, 10µM Fe^{2+}.

MDA als Parameter für die LPO bestimmt wurde.

3.2.1.2. Bildung von Malondialdehyd nach chronischen Alkoholgaben

Die Frage, ob Mitochondrien nach chronischer Alkoholvorbehandlung in vivo eine verstärkte LPO zeigen, ist umstritten (s. Einleitung). Aus der Abbildung 4 (Teil C) ergibt sich aber eindeutig, daß Mitochondrien nach chronischer Alkoholvorbehandlung eine verringerte Neigung zeigen (hoch signifikant: $p < 0{,}001$), in vitro nach Zusatz von Fe^{2+}/ADP MDA zu bilden (Vergleich II und IV).

Das bedeutet, daß entweder die Suszeptibilität der mitochondrialen Lipide gegenüber der LPO aufgrund der Alkoholfütterung verringert ist (Verringerung des Anteils hochungesättigter Fettsäuren), oder daß die Lebensdauer reaktiver Sauerstoffspezies verringert ist (geringere Bildungsrate oder vergrößerte Abbaurate).

Werden den mitochondrialen Suspensionen in vitro geringe Alkoholmengen beigefügt (2,3‰ EtOH≙~50mM) so ergibt sich (Abb. 4, Teil C), daß bei in vivo nicht vorbehandelten Mitochondrien eine signifikante Erhöhung der LPO resultiert (Vergleich I mit II); bei in vivo vorbehandelten Mitochondrien ist der Unterschied nicht signifikant (Vergleich III mit IV). Es zeigt sich daran, daß Alkohol im in vitro Versuch in kleinen Konzentrationen die LPO zu steigern vermag, und dies, obwohl man weiß, daß Alkohole allgemein Inhibitoren radikalisch ablaufender Prozesse sind (s.48). Die im Gesamtergebnis fördernde Wirkung des Alkohols auf die LPO kann auf die membranstabilisierende Wirkung kleiner Konzentrationen von Alkohol (49) zurückgeführt werden. Diese läßt sich auch noch bei etwas höheren Konzentrationen nachweisen (s. Teil B: Kinetik der LPO nach verschiedenen Alkoholgaben). Allerdings nimmt hier der Kopplungsgrad mit zunehmender Alkoholmenge rasch ab (nicht gezeigt), wie man über die Bestimmung des ACR nach der Inkubation feststellen kann.

Es scheint nun so zu sein, daß nach chronischer Alkoholvorbehandlung die spezifische membranstabilisierende Wirkung bei der dann veränderten Membranordnung nicht mehr deutlich wird.

Teil A der Abbildung 4 zeigt den kinetischen Verlauf der MDA-Produktion in den Inkubationen von Teil C. Die dargestellten Kurvenpaare sind repräsentativ. Die Bildungsgeschwindigkeit am Anfang beträgt bei nicht vorbehandelten Mitochondrien 0,06nMol MDA/min/mg Protein. Zusatz von 2,3‰ Alkohol läßt sie auf das doppelte ansteigen (0,11nMol MDA/min/mg

Protein), wohingegen eine chronische Alkoholvorbehandlung diese auf nur 0,02nMol MDA/min/mg Protein verringert.

Zur Begründung für die in A und B festgestellte zeitliche Abnahme der MDA-Bildungsrate (besonders stark ausgeprägt bei nicht vorbehandelten Mitochondrien) läßt sich folgendes sagen:

- Die Begrenzung der LPO könnte ihre Ursache darin haben, daß die durch LPO angreifbaren Fettsäuren verbraucht werden (50). Eine Überschlagsrechnung allerdings zeigt, daß dies nicht sehr wahrscheinlich ist (s. Diskussion).
- Ein weiterer Grund könnte in der zunehmenden Deenergetisierung während der Inkubationszeit liegen. Zunehmende Deenergetisierung

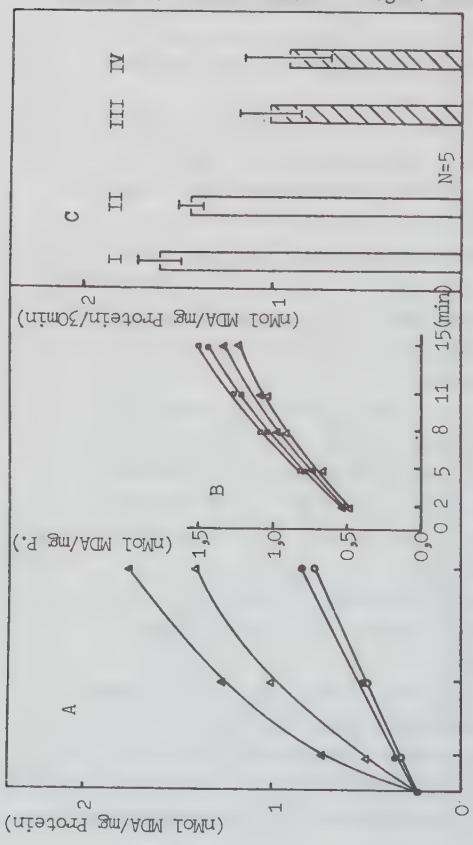


Abb. 4: Die Bildung von MDA in Lebermitochondrien unvorbehandelter und mit Alkohol vorbehandelter Ratten

Die Inkubationen wurden nach Variante A durchgeführt und zwar mit 10mM Succ, 0,6mM ADP, 10µM Fe^{2+}. Es bedeutet in A: (o——o) ≙ IV in C, in vivo chronisch mit Alkohol vorbehandelt; (●——●) ≙ III in C, chronisch vorbehandelt, dazu in vitro 2,3‰ EtOH; in A und B: (▲——▲) ≙ II nichtvorbehandelt; (▲——▲) ≙ I nichtvorbehandelt, aber in vitro 2,3‰ EtOH; in B: (■——■) nichtvorbehandelt, in vitro 7,6‰ EtOH; (□——□) nichtvorbehandelt, 15,3‰ EtOH. Die Werte in C sind Endwerte nach 30 min.

aber ist mit abnehmender LPO korreliert (s.3.2.1.5.). Messungen nach der Inkubation zeigen, daß die Mitochondrien schwächer gekoppelt sind, was allerdings eine teilweise Deenergetisierung beinhaltet.

- Mitochondriale Suspensionen, besonders die nach Alkoholvorbehandlung (in vivo und in vitro), zeigen bei Inkubation eine zunehmende Opaleszenz (Abnahme der optischen Dichte, nicht gezeigt), die als irreversible Schwellung und beginnende Desintegration der Organelle gedeutet werden kann.Simulation dieses Verhaltens durch Zugabe von 1% Tritonlösung zu Mitochondrien zeigt eine starke Abnahme der LPO auf 0,15nMol MDA/mg Protein. Der Zerfall der Membran scheint dabei sowohl die Lebensdauer der reaktiven Spezies von O_2 zu verringern (s.51) als auch einen peroxidativen Mechanismus an sich zu verhindern. (Siehe dazu die Versuche von Slawson et al.(52), die zeigten, daß die LPO einen bestimmten Ordnungsgrad der Fettsäuren voraussetzt: Die LPO ist dann am größten, wenn sie in einer kohärenten monomolekularen Schicht von Fettsäuren abläuft!)

Auch ohne Inkubation findet man in Mitochondrien MDA. Der 0min-Wert der Sofortenteiweißung von 0,22nMol/mg Protein in Abbildung 4 stellt eine solche als Ergebnis einer physiologischen in vivo LPO dar. Diese wird wahrscheinlich durch ubiquitär vorhandene Übergangsmetallionen wie bei der in vitro LPO verursacht (s. Diskussion). Unterschiede zwischen mit Alkohol vorbehandelten und nichtvorbehandelten Lebermitochondrien ließen sich nicht finden.
Einen ähnlichen Wert (0,17nMol MDA/mg Protein) erhält man bei Zugabe von (+) Catechin-Hydrat (100µM) zu einer mitochondrialen Suspension. Catechin wirkt hier radikalhemmend (53). Die destabilisierende Wirkung des Catechin auf die Mitochondrienmembran tritt erst bei höheren Konzentrationen auf (der ACR ändert sich erst ab 400µM Catechin (nicht gezeigt)).

Vergleicht man die LPO in Mitochondrien mit der in Mikrosomen, so zeigt sich bei einer Abschätzung, daß die LPO in Mikrosomen (54) unter etwa gleichen Bedingungen (gleiche Proteinmenge: etwa identische Fettsäurenzusammensetzung, gleiche Fe^{2+}/ADP-Konzentration, Temperatur und O_2-Versorgung) 45 mal stärker ist (zugrunde gelegt wurden Werte von 1,4nMol MDA/30min/mg Protein für Mitochondrien im Status 4 und von 65nMol MDA/30min/mg Protein für Mikrosomen). Bezogen auf den Phospholipidanteil verkleinert sich das Verhältnis auf etwa 1:12. Allerdings kann der mitochondriale Wert erheblich schwanken, weil er stark beeinflußbar ist (s.3.2.1.6.).

3.2.1.3. Bildung von Alkanen nach chronischen Alkoholgaben

Garssen et al. (55) und Riely & Cohen (56) gelang als ersten der Nachweis von Alkanen (hier als Kohlenwasserstoffe bezeichnet) als Zerfallsprodukte von Lipiden (s. auch Abb. 24).

Mitochondrien wurden, wie unter 2.2.2.1. beschrieben, in Glasampullen inkubiert. Im Gasraum fanden sich als Gase die Kohlenwasserstoffe Äthan, Äthylen (in Spuren: i.S.), Propan (nicht auswertbar, da sehr große Schwankungen in der Messung), n-Butan, n-Pentan und i-Pentan (i.S.). Die Werte für Äthan, n-Butan und n-Pentan sind in der Tabelle 4 zusammengetragen.

Standard-diät:	♂			♀		
	Sacch.	p	EtOH	Sacch.	p	EtOH
Äthan	4,5±2,0 (5)	n.s.	7,1±5,2 (5)	6,5±2,0 (3)	-	2,6 (2)
n-Butan	0,0 (5)	-	4,0±2,0 (5)	3,8±1,1 (3)	n.s.	4,2±1,7 (4)
n-Pentan	20,1±5,9 (5)	n.s.	28,6±20,0 (5)	15,2±4,0 (3)	0,05	6,5±3,8 (4)
Palmin-diät:						
Äthan	0,0 (6)	-	0,0 (4)	3,9±2,3 (6)	-	2,3 (2)
n-Butan	2,9 (2)	n.s.	2,8±1,6 (3)	3,4±1,9 (5)	-	2,8 (2)
n-Pentan	10,6±8,6 (6)	-	8,6 (2)	10,3±5,6 (6)	n.s.	6,7±4,7 (6)

Tab. 4: Die Bildung von Kohlenwasserstoffen in Lebermitochondrien in Abhängigkeit von der Diät mit und ohne chronische Alkoholgaben (Angaben in pMol/mg Protein/30min)
Die Inkubationen wurden durchgeführt wie in 2.2.2.1. beschrieben und zwar mit 10mM Succ, 0,6mM ADP und 10µM Fe^{2+}.
Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Inkubationen an.

Sie lassen erkennen, daß es bei der Bestimmung der Kohlenwasserstoffe zu erheblichen Streuungen kommt. Trotzdem lassen sich einige deutliche Unterschiede ableiten.

Aus der Größenordnung der Werte ersieht man, daß die Bildung von Alkanen bei der LPO nur einen Nebenweg darstellen kann, wenn man zum Vergleich die Bildung von MDA heranzieht. Letztere ist etwa um den Faktor 1000 stärker ausgeprägt als die Bildung von Alkanen. Das wiederum bedeutet, daß bei einem so geringen Umsatz kleinste Änderungen und Beeinflussungen des molekularen Mechanismus, der entweder zu MDA oder zu den Alkanen (neben vielen anderen Produkten) führt, die Streuung erheblich vergrößern.

Bei Rattenlebermitochondrien von männlichen Tieren zeigt chronische Gabe von Alkohol keine deutlichen Unterschiede (leichte Erhöhung der Werte) mit der Ausnahme, daß nur unter Alkoholeinfluß n-Butan gebildet wird. Ersetzt man dagegen die Standard- durch die Palmindiät, so erkennt man eine deutliche Abnahme der gebildeten Gasmengen: Äthan läßt sich nicht mehr nachweisen und n-Pentan vermindert sich auf die Hälfte; n-Butan ist weniger stark betroffen.

Bei Lebermitochondrien von weiblichen Ratten zeigt sich nach chronischen Alkoholgaben auch nur geringfügige Beeinflussung der produzierten Alkanmengen. Ausnahme ist n-Pentan, das nach Alkohol stark abnimmt. Bei Palmin-, statt Standarddiät ergeben sich Werte wie bei den Mitochondrien männlicher Tiere, allerdings kann Äthan hier nachgewiesen werden.

Insgesamt kann man feststellen, daß die beobachteten Effekte an Mitochondrien von männlichen Ratten wesentlich ausgeprägter sind, als an Mitochondrien von weiblichen Ratten.

3.2.1.4. Diätabhängige LPO in Rattenlebermitochondrien nach chronischen Alkoholgaben.

Parallel zu der Bestimmung der Alkane in 3.2.1.3. wurde nach dem gleichen Ansatz die MDA-Produktion gemessen (Tab. 5). Es zeigt sich, daß chronische Alkoholgaben die Suszeptibilität gegenüber LPO auslösenden Substanzen (hier: Fe^{2+}/ADP) erniedrigten - sowohl bei der Standard- als auch bei der Palmindiät (das entspricht den Aussagen der Abb. 4, Teil A und C, hinsichtlich Mitochondrien männlicher Ratten). Die Erniedrigung der MDA-Werte ist dabei besonders stark ausgeprägt bei Alkoholgaben unter Standarddiät (Vergleich ab) bei Mitochondrien männlicher Ratten und bei Mitochondrien weiblicher Ratten, die mit Palmin gefüttert wurden (Ver-

Standard-diät:	♂		♀	
	Sacch.	chronisch EtOH	Sacch.	chronisch EtOH
	1,37±0,19[a] (5)	0,72±0,06[b] (5)	0,72±0,02[c] (3)	0,54±0,05[d] (4)
Palmin-diät:	0,94±0,23[e] (6)	0,64±0,13[f] (4)	0,65±0,04[g] (6)	0,26±0,09[h] (6)

ab : $p < 0,001$
cd : $p < 0,001$

ef : $p < 0,05$
gh : $p < 0,001$

ae : $p < 0,01$
bf : n.s.

cg : n.s.
dh : $p < 0,001$

Tab. 5: Exogene Induktion der LPO in Rattenlebermitochondrien in Abhängigkeit von der Diät mit und ohne chronische Alkoholgaben (Angaben in nMol MDA/mg Protein/30min).
Die Inkubationen wurden nach Variante A durchgeführt mit 10mM Succ, 50µM ADP und 10µM Fe^{2+}.
Klammerausdrücke geben die Anzahl der Inkubationen an.

gleich gh). Dies ist umso erstaunlicher, weil für die "antioxidant capacity" bei männlichen Ratten festgestellt wurde, daß sie nach chronischen Alkoholgaben erniedrigt ist (57).

Die Palmindiät selbst erniedrigt die LPO nur bei Mitochondrien männlicher Ratten unter Saccharose (Vergleich ae), und bei weiblichen unter Alkoholeinfluß (Vergleich dh). Das bedeutet, daß Alkohol, Palmindiät oder die Kombination von beiden bei männlichen Mitochondrien die LPO auf einen Wert verringern, der in etwa dem Kontrollwert (Saccharosefütterung) von Lebermitochondrien weiblicher Ratten entspricht. Bei letzteren führt erst die Kombination von Palmindiät und Alkohol zur erneuten Depression der LPO.

Vergleich von a mit c zeigt ferner, daß die Suszeptibilität von Mitochondrien weiblicher Ratten verringert ist im Vergleich zu Mitochondrien männlicher Tiere. Neben dem vermuteten Einfluß des Fettsäurenmusters auf den Grad der Suszeptibilität (was Tab. 16 und 17 bestätigen) könnte auch die sogenannte "antioxidant capacity" eine Rolle spielen.

Der Vergleich von Tabelle 4 mit 5 zeigt, daß die Bildung von Kohlenwasserstoffen mit der von MDA nicht immer synchron einhergeht. In erster Näherung kann nur gesagt werden, daß die Verfütterung von Palmin zu einer Verringerung der Kohlenwasserstoff- bzw. MDA-Mengen führt.

Die Bildung von MDA und Alkanen ist abhängig von einer Vielzahl von Reaktionen, die im einzelnen unbekannt sind. Erst die Kenntnis jedes einzelnen Reaktionsschrittes erlaubte eine Interpretation der Werte von Tab. 4 im Zusammenhang mit Tab. 5 (s. Theoretischer Teil).

3.2.1.5. Abhängigkeit der LPO vom akzidentiellen ACR nach chronischen Alkoholgaben.

Werden die Einzelwerte der in Tabelle 5 gemittelten Werte der LPO unter Standarddiät gegen die jeweils bei den einzelnen Mitochondrienpräparationen gemessenen ACR aufgetragen, so ergibt sich die hochsignifikante Korrelation nach Abbildung 5. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r=0,735$ und damit $p < 0,001$. Unter einer Palmindiät läßt sich dieser Zusammenhang nicht darstellen (nicht gezeigt)!

Man kann aus der Abbildung ersehen, daß die Korrelation von ACR und LPO gut gegeben ist für alle Mitochondrien von Kontrollratten, wobei sich möglicherweise die Zuordnung von Mitochondrien männlicher und weiblicher Tiere nur zufällig ergibt; dann nämlich, wenn die antioxidative Kapazität (das bedeutet u.a. der Vitamin E Gehalt) in beiden Geschlechtern unterschiedlich ist. Deutlich ist zu erkennen, daß chronische Alkoholvorbehandlung zu einer Kumulation der Werte in der Mitte des Diagramms führt.

Die erhaltene Abhängigkeit ist für ßHOB als Substrat nicht so darstellbar, da man nach 3.2.1.1. von einer Veratmung des MDA ausgehen muß, die aber nicht genau genug kontrollierbar und quantifizierbar ist.

Aus den obigen Ergebnissen kann man schließen, daß der gemessene ACR bei hinreichenden Vorsichtsmaßnahmen (s. Diskussion) ein Kriterium für den tatsächlichen integralen Zustand der Mitochondrienmembran sein kann.

Aus Abbildung 5 ergab sich: je größer der ACR, desto größer die LPO (s.o.). Vorbehandlung mit Alkohol erniedrigt den ACR, d.h. er verringert den Kopplungsgrad der Mitochondrien: die endogene Atmung nimmt zu. Diese Zunahme der Endogenatmung ist aber nur denkbar durch Veränderungen der permeativen Eigenschaften der Membran. Da dies auf verschiedenen Wegen erreicht werden kann, soll hier ihre Änderung durch das Fettsäurenmuster

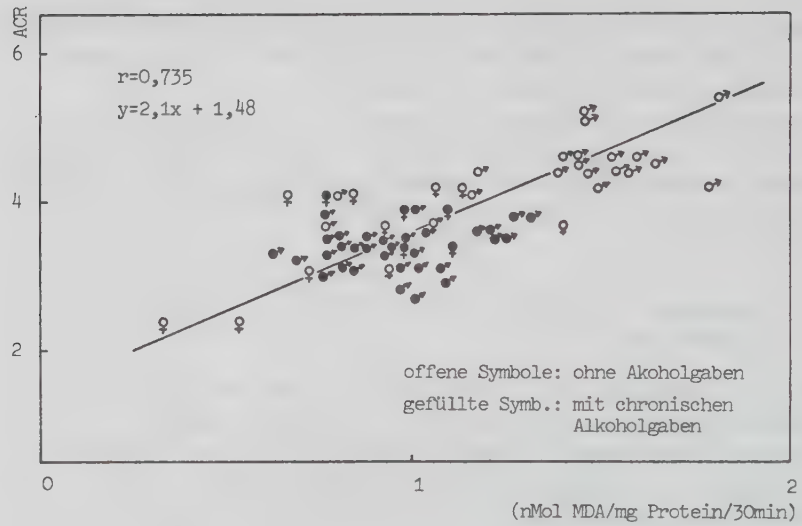


Abb. 5: Abhängigkeit der LPO vom akzidentiell gefundenen ACR der Mitochondrien von männlichen und weiblichen Ratten
Die Inkubationen wurden nach Variante A durchgeführt mit folgenden Zusätzen: 10mM Succ, 0,6mM ADP und 10µM Fe^{2+}. Jedes Symbol repräsentiert eine Mitochondrienisolierung.

der Membran vermutet werden. Genau dies ließ sich auch aus den Fütterungsversuchen mit Palmindiät schließen, da bekannt ist, daß diätare Maßnahmen gezielte Veränderungen des Membranaufbaus ermöglichen (58,59,60,61 u.a.).

Erkennbar wurden die o.g. Veränderungen durch die festgestellte geringere Suszeptibilität der Membran gegenüber LPO auslösenden Substanzen (hier: Fe^{2+}/ADP). Nach herkömmlichen Modellvorstellungen ist deshalb ein höherer Sättigungsgrad der Fettsäuren anzunehmen und möglicherweise auch eine Veränderung des Phospholipidmusters der Membran (s.3.4.).

3.2.1.6. Manipulation der LPO in Rattenlebermitochondrien

3.2.1.6.1. Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung

Die ACR der Abbildung 5 ergaben sich als akzidentielle Größen bei verschiedenen Mitochondrienpräparationen. Entkoppler der oxidativen Phosphory-

lierung sind nun in der Lage, konzentrationsabhängig definierte ACR einzustellen, d.h. die mitochondriale Membran wird in ihren permeativen Eigenschaften so verändert, wie wenn die in 3.2.1.5. geforderte veränderte Fettsäurenzusammensetzung die Ursache wäre. Dies muß allerdings nicht notwendigerweise zu gleichen Resultaten führen, weil zwar das Resultat der Veränderungen als gleich anzusehen ist (Erhöhung der Protonenpermeabilität, d.h. Verringerung des ACR), aber die gemessenen Veränderungen selbst verschiedene Ursachen haben (Veränderung des Fettsäurenmusters der Membran: intrinsic factor bzw. Erniedrigung der Permeabilitätsschranke durch Entkoppler: extrinsic factor).

Die Konzentrationsabhängigkeit der LPO wurde für verschiedene Entkoppler untersucht: Abbildung 6, Teil A, zeigt die Abhängigkeit der LPO nach Zusatz verschiedener FCCP-Mengen (diese entsprechen definierten ACR, wie Abbildung I des Anhangs zeigt). Es wurde hier neben Succ auch ß-HOB als Substrat eingesetzt, obwohl Abbildung 3 zeigt, daß dann gebildetes MDA nicht quantitativ erfaßt wird. Zudem wurde sowohl im Status 4 als auch im Status 3 der Atmung gemessen.

Es zeigt sich, daß im Status 4 die LPO mit ßHOB immer deutlich stärker ausfällt als mit Succ. Darüberhinaus ist die LPO mit beiden Substraten im Status 3 geringer als im Status 4.
Man ersieht aus der Abbildung 6, daß die LPO in Abhängigkeit von der FCCP-Konzentration abfällt. Allerdings verläuft dieser Abfall am Anfang sehr steil, erreicht dann einen Basiswert und verändert sich dann nicht mehr. Für ß-HOB im Status 3 verändert sich die LPO gar nicht, was aber wahrscheinlich darauf beruht, daß die Veratmung von MDA im Status 3 schon zu Beginn so stark erhöht ist, daß keine Netto-MDA-Mengen mehr feststellbar sind.

Ein ähnlich wirksamer Entkoppler wie FCCP ist CCCP. Teil B der Abbildung 6 zeigt, daß bei ß-HOB ein Kurvenverlauf für die LPO erhalten wird, der dem in Teil A entspricht. Succ als Substrat führt auch zu der üblichen Abnahme der LPO, aber dann ist ein deutlicher und sprunghafter Wiederanstieg (signifikant mit $p < 0{,}05$) festzustellen (s. Teilzeichnung), wenn die Atmung im Status 3 verläuft. Die Status 4-Atmung führt zu einem schwächeren Wiederanstieg.

Der Wiederanstieg der LPO muß bedeuten, daß der Entkoppler CCCP spezifisch in den molekularen Ablauf der LPO eingreift, und dieses entweder selbst bewerkstelligt als Überträger von Elektronen und Bildung einer radikalischen Struktur oder als Modulator des Redoxgrades von entsprechenden Atmungs-

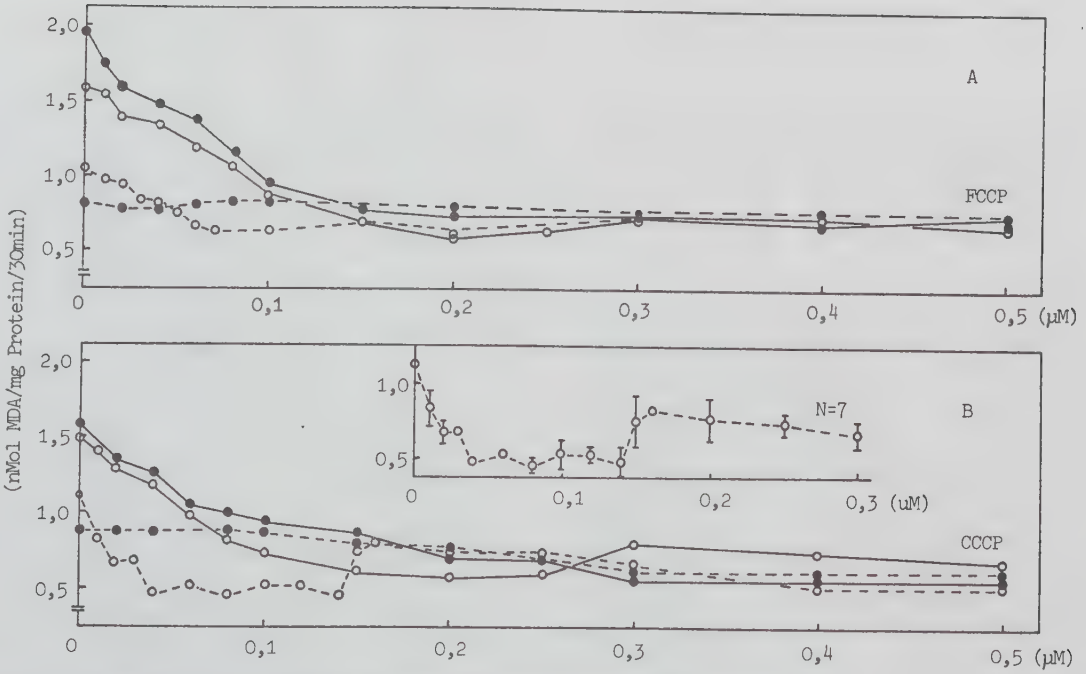


Abb. 6: Abhängigkeit der LPO von der Konzentration verschiedener Entkoppler
Die Inkubationen wurden nach Variante A durchgeführt. (● —— ●) ß-HOB, Status 4; (●- - - - -●) ß-HOB Status 3; (○ —— ○) Succ, St. 4; (○- - - -○)Succ, St. 3;auch Inset in B; Erläuterungen s. Anhang 8.2. Die Kurvenpunkte ergeben sich als Mittelwerte aus 4 Einzelbestimmungen verschiedener Präparationen.

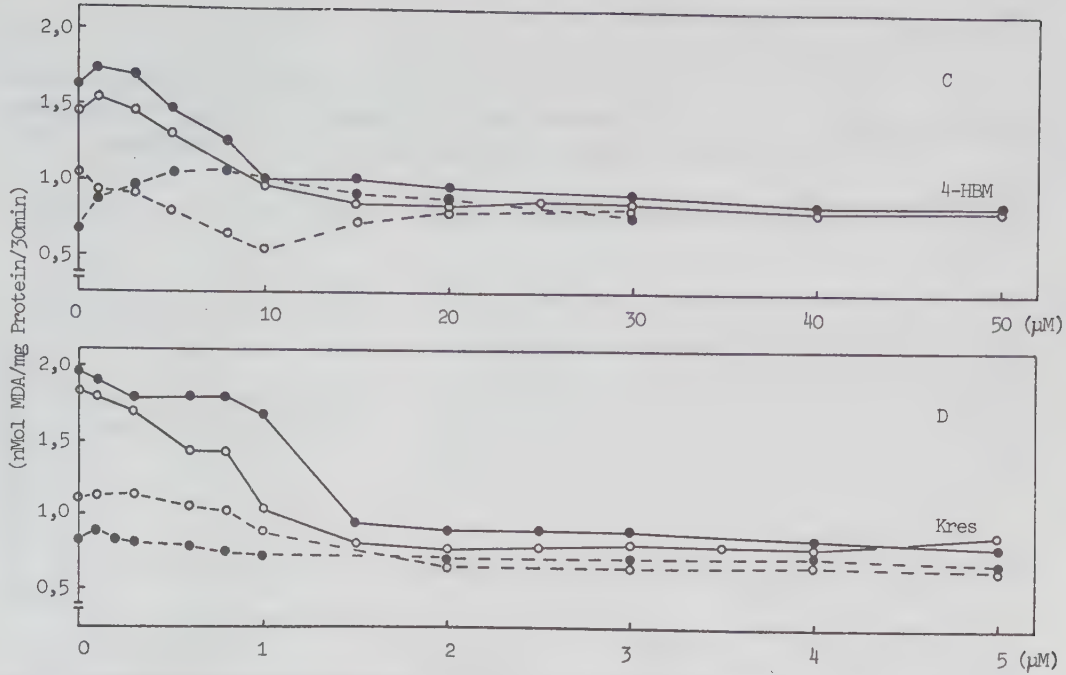


Abb. 7: Abhängigkeit der LPO von der Konzentration verschiedener Entkoppler
Erläuterungen s. vorhergehende Abbildung. Die Kurvenpunkte ergeben sich als Mittelwerte aus 3 Einzelbestimmungen verschiedener Präparationen

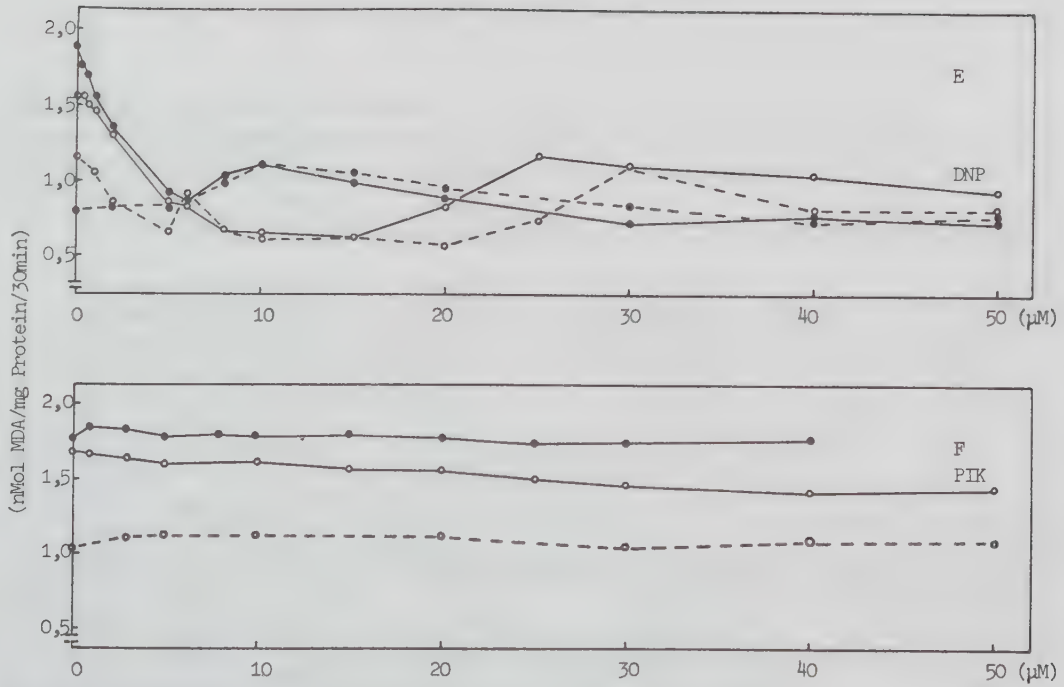


Abb. 8: Abhängigkeit der LPO von der Konzentration verschiedener Entkoppler
Erläuterungen s. vorhergehende Abbildung. Die Kurvenpunkte ergeben sich als 3 (Teil E) bzw. 2(Teil F) Einzelbestimmungen verschiedener Präparationen.

kettenkomponenten. Die Erhöhung der Protonenpermeabilität ist unspezifisch, da sie allen Entkopplern gemeinsam ist.

Andere Entkoppler zeigen folgendes Verhalten: 4-Hydroxybenzyliden-malondinitril (4-HBM) (Abb. 7, Teil C) verhält sich wie FCCP, mit der Besonderheit, daß mit ß-HOB als Substrat im Status 3 zu Beginn ein Ansteigen der LPO zu beobachten ist, und dies, obwohl MDA veratmet wird und aufgrund der Erhöhung der Protonenpermeabilität ein Absinken des ACR erfolgt. Mit 2,4-Dinitrokresol (Kres) ist dieser Effekt kaum vorhanden (Abb. 7,D).

Erwähnt sei noch 2,4-Dinitrophenol (DNP) (Abbildung 8, Teil E). Hier läßt sich für alle Substrate im Status 4 und im Status 3 ein Wiederanstieg der LPO feststellen. Dies ist besonders ausgeprägt für Succ. Insgesamt entspricht dies etwa der Wirkung von CCCP.

Von der Pikrinsäure (PIK) ist bekannt, daß sie nicht als Entkoppler wirken kann, wenn sie unverändert intakten Mitochondrien angeboten wird (62). Bei Messung der LPO ist auch keine deutliche Wirkung festzustellen (Abb. 8, Teil F). Dies bedeutet, daß der Entkoppler, wenn er die LPO beeinflussen soll, die mitochondriale Membran passieren muß. Bei der Passage könnte dann entweder seine Eigenschaft als Shuttle für Protonen und/oder sein Redoxverhalten (Überträger von Elektronen) und/oder seine indirekte Wirkung auf entsprechende Atmungskettenkomponenten (Beeinflussung des Reduktionsgrades) für die LPO ausschlaggebend sein (s. Theoretischer Teil).

3.2.1.6.2. Atmungsketteninhibitoren

Die Beeinflußbarkeit der LPO durch Entkoppler setzt voraus, daß der Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf ungesättigte Fettsäuren vom energetischen Zustand der Mitochondrienmembran abhängt. Inhibitoren des Elektronenflusses der Atmungskette verändern den Redoxzustand der Atmungskettenkomponenten, und sie haben auch deutliche Veränderungen der LPO zur Folge, wie Tabelle 6 zeigt.
Zum Vergleich sind in der obersten Spalte die Werte für die LPO mit Succ und ß-HOB als Substrate ohne Inhibitoren hinzugefügt. Gegenüber Status 4 ist im Status 3 mit Succ eine signifikant verringerte LPO festzustellen. ß-HOB zeigt im Status 4 eine sehr hohe LPO und dies, obwohl MDA veratmet wird. In beiden Fällen scheint also der Elektronendruck, der sich in den Redoxgraden der Anfangsglieder der Atmungskette manifestiert, eine bedeutsame Rolle zu spielen (s. Theoretischer Teil).

Rotenon hemmt den Elektronentransport am Komplex I der Atmungskette, d.h. NAD-seitig wird die Atmungskette stark reduziert, auf der Seite des Sauerstoffs aber oxidiert. Bei Zugabe von ß-HOB läßt sich ein deutlicher Anstieg der LPO feststellen (1,20 gegenüber 1,69 nMol MDA/mg Protein/30min), was einer erhöhten Produktionsrate reaktiver Spezies entsprechen könnte, wenn auch gleichzeitig die Veratmung von MDA durch Rotenon gehemmt wird. Aber auch Succinat erhöht hier die LPO. Anscheinend wird trotz Rotenon noch ein starker Elektronendruck vom Komplex II her auf NAD erreicht, was der Umkehr der oxidativen Phosphorylierung entspricht. Dieser Effekt scheint besonders stark ausgeprägt zu sein im Status 4 wie Versuche nach der Variante B belegen (Steigerung der LPO von 0,19 auf 0,36nMol MDA/mg Protein/7min).
Gibt man Antimycin A zu den mitochondrialen Suspensionen, so erfolgt Hemmung des Elektronenflusses beim Übergang von Coenzym Q auf Komplex III. Die Werte für die LPO sind fast identisch mit den Ausgangswerten. Hier scheint es trotz eines hohen Elektronendruckes vor der Hemmstelle (also substratseitig) zu einer sehr effektiven Löschung der entstandenen Radikale zu kommen. Dies kann nur durch sauerstoffseitige Glieder der Atmungskette geschehen, weil nur diese dann oxidiert sind (s. Theoretischer Teil).
Die noch zu beobachtende Statusabhängigkeit der LPO liegt möglicherweise in der nicht vollständigen Hemmung der Atmungskette durch Antimycin A begründet.

Zugabe des terminalen Hemmers KCN bringt die LPO allgemein auf Werte, die dem deenergetisierten Zustand 3 entsprechen. Mit KCN ist auch das terminale Ende der Atmungskette zumindestens teilweise reduziert. Der restliche dann noch oxidierte Teil scheint auszureichen, um eine Zunahme der LPO zu verhindern.

Im Überblick zeigt sich, daß die LPO im Status 3 im Gegensatz zum Status 4 fast unabhängig von der Atmung ist. Daraus ist zu schließen, daß die mitochondriale LPO aus zwei Komponenten besteht, aus einem atmungsunabhängigen und atmungsabhängigen Anteil.

	Variante A		Variante B	
	Status 4	Status 3	Status 4	Status 3
Succ	1,37±0,26[a] (10)	1,03±0,22[b] (10)	0,19±0,03[c] (7)	0,14±0,01[d] (7)
ß-HOB	1,97±0,21 (6)	1,20±0,17 (6)	-	-
ROT:				
Succ	-	1,40±0,10[f] (6)	0,36±0,04[e] (6)	0,15 (3)
ß-HOB	-	1,69±0,29[h] (6)	-	-
AA:				
Succ	-	1,03±0,08[g] (6)	0,22 (3)	0,16 (3)
ß-HOB	-	1,31±0,25[i] (6)	-	-
KCN:				
Succ	-	1,05±0,08 (6)	0,15 (3)	0,15 (3)
ß-HOB	-	1,52±0,18 (6)	-	-

ab : $p < 0,05$
cd : $p < 0,001$
ce : $p < 0,01$
fg : $p < 0,001$
hi : $p < 0,05$

Tab. 6: Beeinflussung der LPO durch Atmungsketteninhibitoren unter verschiedenen Atmungszuständen (Angaben in nMol MDA/mg Protein/30 bzw. 7min)
Inkubation nach Variante A: 10mM Succ, 0,6mM ADP, 10µM Fe^{2+}
Inkubation nach Variante B: 10mM Succ, 60µM ADP, 10µM Fe^{2+}. Zusätzlich waren enthalten: Rotenon (ROT) 50µM, Antimycin A (AA) 10µM oder KCN 1mM.
Für die Status 3-Atmung wurde in beiden Fällen ein ADP-regenerierendes System benutzt: 10mM Glucose, 2µl Hexokinase.
Klammerausdrücke geben Zahl der Inkubationen an. In Gegenwart von Atmungshemmern bedeutet die Angabe des "Atmungsstatus" lediglich Zugabe entsprechend diesen Zuständen.

3.2.1.6.3. Anionen, Kationen und andere Substanzen

Membranen tragen zu beiden Seiten eine negative Überschußladung. Diese ist bei Mitochondrien aufgrund des Atmungszustandes veränderbar: für die Außenseite der Membran gilt, daß sie groß ist bei Energetisierung und klein bei Deenergetisierung (s.7.2.) Der Abnahme der LPO im Status 3, entspricht eine Deenergetisierung der Mitochondrienmembran. In der hierbei auftretenden Abnahme der negativen Oberflächenladungsdichte kann man auch eine Abnahme der Käfigfunktion der Membran für negativ geladene Sauerstoffspezies sehen. Damit würde die Dauer des Verbleibs in der Membran und folglich auch die LPO absinken (s. Theoretischer Teil).
Manipulation der negativen Oberflächenladung durch Veränderung des Membranaufbau selbst, oder durch Aufbringen von Anionen oder Kationen resultieren in einer entsprechenden Zu- oder Abnahme der LPO, wie dies die Tabellen 7 und 8 und die Abbildungen 9 und 10 zeigen.

Zusatz	♂ Sacch.	♂ chronisch EtOH	♀ Sacch.	♀ chronisch EtOH
	(nMol MDA/mg Protein/30min)			
-	1,37±0,19 (5)	0,72±0,06 (5)	0,72±0,02 (3)	0,54±0,05 (4)
Atr	1,85±0,26[a] (5)	1,19±0,16[b] (5)	1,31±0,34 (5)	1,07±0,08 (5)

ab : $p < 0,01$

Tab. 7: Geschlechtsabhängige exogene Induktion der LPO in Rattenlebermitochondrien unter dem Einfluß von Atraktylosid mit und ohne chronische Alkoholvorbehandlung.
Die Inkubationen wurden nach Variante A durchgeführt mit 10mM Succ, 0,6mM ADP, 10µM Fe^{2+} und 50µM Atraktylosid (Atr).

Anionen:
Nach Tab. 7 führt Zugabe von Atraktylosid (Atr), einem Anion, immer zu einer Erhöhung der LPO, wenn man unter Kontrollbedingungen den Wert von Tabelle 6 (1,37nMol MDA/mg Prot./30min) mit dem von Tabelle 7 (1,85 nMol MDA/mg Prot./30min) vergleicht. Dies bedeutet, daß mit der Erhöhung der negativen Oberflächenladungsdichte der Mitochondrienmembran eine Erhöhung der LPO verbunden ist.

Tabelle 8 zeigt verschiedene anionische Moleküle, die dazu in der Lage sind (für BSP siehe Schwenk et al. (63)).

Entsprechend des Konzeptes des Einflusses der Oberflächenladungsdichte führt der Übergang von der Status 4- in die Status 3-Atmung zu einer Abnahme der LPO. Auch nach chronischen Alkoholgaben führt Atraktylosid zu einer relativ gleich erhöhten LPO (Tab. 7). Dies gilt für Mitochondrien von männlichen und weiblichen Ratten, wobei die Mitochondrien weiblicher Ratten auch hier unter Kontrollbedingungen (Saccharoseverfütterung) geringere LPO zeigen.

Zusatz	Variante A		Variante B	
	Status 4	Status 3	Status 4	Status 3
–	1,37±0,26 (10)	1,03±0,22 (10)	0,19±0,03 (7)	0,14±0,01 (7)
Atr	1,85±0,26	-	0,44	0,20
BSP	1,51±0,11[a]	1,11±0,10[b]	0,35	0,15
Heparin	-	-	0,27	0,15
OM	-	-	0,34	0,17
ATP	-	-	0,34	0,17

ab : $p < 0,001$; N=4 für Variante A; N=3 für Varinate B, wenn nicht anders angegeben

Tab. 8: Exogene Induktion der LPO in Rattenlebermitochondrien unter Einfluß von Anionen (Angaben in nMol MDA/mg Protein/30 bzw. 7min)
Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Tabelle 6, mit 10mM Succ; zusätzlich 50µM Atraktylosid (Atr), 10µM Bromsulphthalein (BSP), 3,2µM Heparin, 2µg/ml Oligomycin (OM), 60µM ATP.

Wie Abbildung 9 zeigt, läßt sich hier ebenso der Zusammenhang von Kopplungsgrad (formal als ACR) und LPO nachweisen!

Kationen:
Kationen erniedrigen die negative Oberflächenladungsdichte, und sie führen damit zu einer Erniedrigung der LPO wie das Abb. 10 zeigt. Mit der Zugabe von Amitryptilin ist beim Atmungsexperiment eine konzentrationsabhängige Zunahme der Atmung verbunden (nicht gezeigt).
Cytochrom c ist kationisch. Man beobachtet auch hier eine Abnahme der LPO nach Zugabe (Tab. 9).

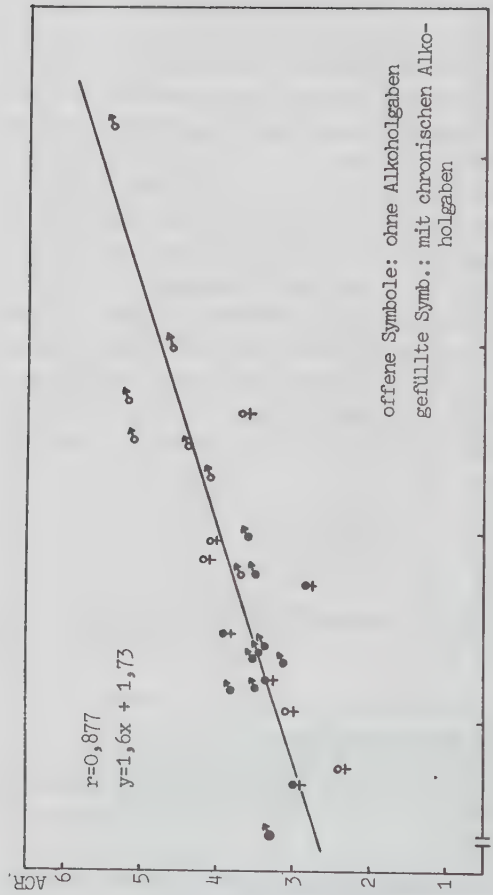


Abb. 9: Abhängigkeit der LPO unter dem Einfluß von Atraktylosid vom akzidentiell gefundenen ACR
Die Inkubationen wurden nach Variante A durchgeführt (s. Abb. 5) mit 50µM Atraktylosid. Der ACR wurde parallel in Abwesenheit von Atraktylosid bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert eine Mitochondrienisolierung.

Es wird angenommen, daß Cytochrom c bei Anlagerung an die Membran als Akzeptor für reaktive Sauerstoff-Spezies fungiert (s. Theoretischer Teil). Eine Wirkung tritt allerdings erst bei einer mehrfachen Konzentration des endogenen Cytochrom c ein (s. Tab. 15).

Cytochrom c		LPO (nMol MDA/mg Protein/7min)	
(µM)	(nMol/ mg Prot.)	Status 4	Status 3
-	-	0,22	0,14
0,05	0,025	0,23	0,07
0,25	0,125	0,22	0,07
1,25	0,625	0,21	0,07
5,00	2,5	0,14	0,08
25,00	12,5	0,09	0,07

Tab. 9: LPO in Abhängigkeit von der Cytochrom c-Konzentration
Die Inkubationen wurden nach Variante B durchgeführt: 10mM Succ, 60µM ADP und 10µM Fe^{2+}, ADP-regenerierendes System für den Status 3: 10mM Glucose, 2µl Hexokinase.
Auffällig ist die sehr geringe LPO im Status 3 nach Cytochrom c-Zugabe.

Andere Substanzen:

Tabelle 10 zeigt, daß Zugabe von NADH und NADPH zu mitochondrialen Suspensionen im Status 4 zu einer sehr starken Zunahme der LPO führt. Diese LPO ist ausgeprägt atmungsabhängig, denn sie verringert sich deutlich im Status 3. Beide Cosubstrate sind normalerweise nicht membrangängig bei Mitochondrien. Ob dies auch für Mitochondrien nach chronischer Alkoholvorbehandlung gilt, ist umstritten (64,65).
Die im Verhältnis zu ß-HOB überproportionale Steigerung der LPO mit NADH im Status 4 ist vielleicht auf Bildung von NAD-Radikale (NAD•) zurückzuführen. Diese sind in der Literatur beschrieben (s. 66,67). Ihre Bildung ist nur bei stark negativem Redoxpotential (großer Überschuß von NADH) begünstigt, da der Ein-Elektronen-Schritt von NADH→NAD• ein negativeres Potential hat als der Zwei-Elektronen-Schritt NADH → NAD^+.
Bei NADPH ist zusätzlich noch mikrosomale LPO beteiligt, da Mitochondrien immer zu wenigen Prozent (~5%) mit Mikrosomen kontaminiert sind.

Wäscht man Mitochondrien nach Schwellung in hypotoner Lösung Cytochrom c-frei (68), dann fällt die LPO auf sehr niedrige Werte. Offensichtlich ist durch die Schwellung der Mitochondrien eine Veränderung in der Membran erfolgt, die entweder radikalisch ablaufende Prozesse verhindert oder der Bildung reaktiver Spezies entgegensteht: Die Membran ist im wahrsten Sinne des Wortes löcherig geworden. Erneute Zugabe von NADH oder NADPH

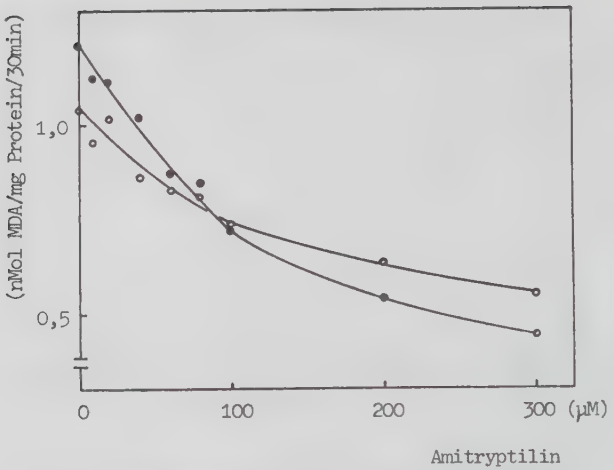


Abb. 10: Abhängigkeit der LPO von der Amitryptilinkonzentration
Die Inkubationen wurden nach Variante A im Status 4 durchgeführt: (• —— •) 10mM ß-HOB, (o —— o) 10mM Succ; 0,6mM ADP und 10µM Fe^{2+} für beide.

führte zu einer Verstärkung der LPO, die bei NADPH den Wert der Kontrolle erreicht und bei NADH etwa halb so groß ist (Tab. 10, 4. Zeile). Werden die Cytochrom c-freien Mitochondrien wieder mit Cytochrom c supplementiert, so sinkt die LPO nur bei NADPH stark, kaum dagegen bei NADH. Tabelle 9 zeigt allerdings, daß die hier eingesetzte Konzentration an Cytochrom c dort noch keinen Einfluß auf die LPO hatte.

Substrate des Site III der Atmungskette führen zu einer LPO wie sie in Tabelle 11 dargestellt ist. Tetramethylphenylendiamin (TMPD) hemmt die LPO. Es wirkt wahrscheinlich als Radikalfänger, da es membrangängig ist. Diese Potenz als Hemmer radikalisch ablaufender Prozesse wird besonders deutlich mit Ascorbinsäure, denn Ascorbinsäure allein führt im Status 4 zu einer sehr starken LPO. Kombination beider senkt die LPO auf den Wert des TMPD ab.

Es fällt auf, daß das Verhalten von Ascorbinsäure auf die LPO deutlich vom Atmungszustand abhängt. Im Status 3 wird ein Wert erreicht, der dem unter Kontrollbedingungen entspricht. Daraus kann geschlossen werden, daß durch Änderung des Redoxgrades von Komponenten der Atmungskette ein

Zusätze	LPO (nMol MDA/mg Protein/7min)	
	Status 4	Status 3
-	0,22	0,14
NADH:	0,62	0,47
Cytochrom c arm	0,08	0,07
Cyto. c arm, NADH	0,33	0,47
Cyto. c arm, NADH, + Cytochrom c	0,30	0,39
NADPH:	0,95	0,22
Cyto. c arm, NADPH	0,95	0,80
Cyto. c arm, NADPH, + Cytochrom c	0,65	0,60

Tab. 10: Abhängigkeit der LPO von den Cosubstraten NADH und NADPH und von Cytochrom c
Die LPO wurde nach Variante B bestimmt mit 10mM Succ, 60µM ADP, 10µM Fe^{2+}, 200µM NADH, 200µM NADPH und 0,25µM Cytochrom c. Cytochrom c-arme Mitochondrien wurden nach Jacobs und Sanadi (68) dargestellt.

endogener Quencher der LPO wirksam wird (s. Theoretischer Teil).

Zusätze	LPO (nMol MDA/mg Protein/7min)	
	Status 4	Status 3
-	0,22	0,14
TMPD	0,10	-
TMPD/Ascorbinsäure	0,08	-
Ascorbinsäure	1,91	0,15
TMPD/Antimycin A	0,08	-
Antimycin A	0,22	0,16

Tab. 11: LPO mit Substraten am "Site III" der Atmungskette
Die Inkubationen entsprechen denen der Tab. 10 mit 10µM Tetramethylphenylendiamin (TMPD), 0,5mM Ascorbinsäure und 10µM Antimycin A.

Die Effektivität von TMPD als Radikalfänger zeigt sich bei Zugabe von Antimycin A. Die Kontrollwerte werden auch hier nicht erreicht.

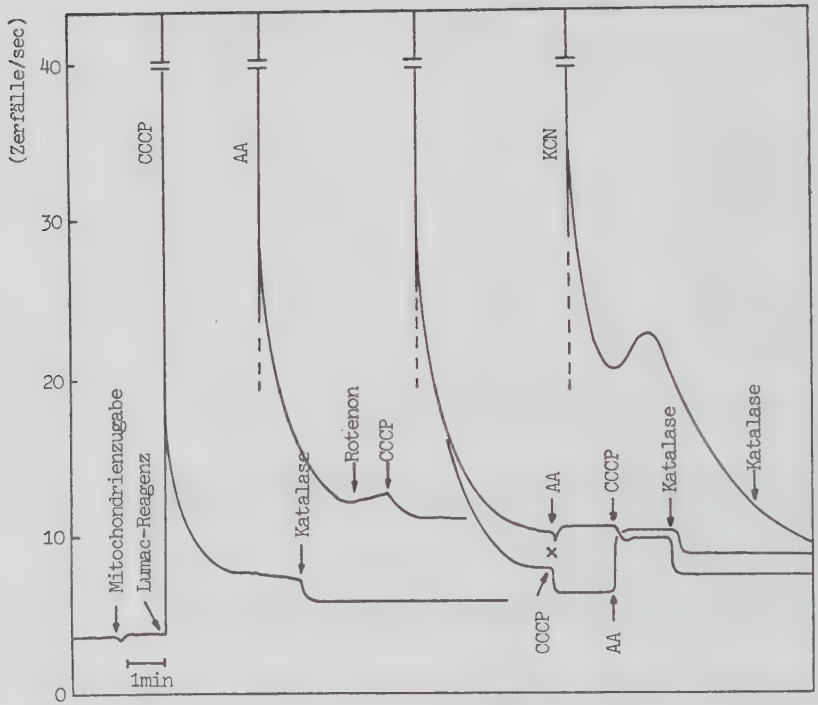


Abb. 11: Messung der Chemilumineszenz bei verschiedenen mitochondrialen Zuständen

Die Messung erfolgte nach Variante A mit 1,2mg Protein, 2,5mM Succ und dem oben bezeichneten Reagenz: 1µM CCCP, 5µM Antimycin A (AA), 1mM KCN. Der Start der Abklingreaktion erfolgte mit Zugabe von 100µl Lumac-Reagenz (≙ Lumanol-Reagenz). Weiter wurden zugesetzt 10µM Rotenon und 5µl Katalase.

3.2.1.7. Messung der Initialradikalbildung

Die Bildung von radikalischen, reaktiven Spezies ist über Chemilumineszenz nachweisbar. Bei den herkömmlichen Meßgeräten muß als Mediator Luminol bei möglichst hohem pH benutzt werden.

Abbildung 11 zeigt die Abklingkurven der mit dem Lumac-Reagenz (≙ Lumanol-Reagenz: s. 2.2.2.2.) ausgelösten Chemilumineszenz bei pH 10.

Mitochondrien zeigen im Atmungsexperiment unter diesen Bedingungen stark verringerte Atmung. Trotzdem scheint die Radikalbildung aufgrund unter-

schiedlichen Redoxgrades bestimmter Atmungskettenkomponenten noch beeinflußbar zu sein. Bei einem pH von 8,5, bei dem die mitochondriale Atmung kaum beeinflußt ist, lassen sich nur Kurven nach Abbildung 12 erhalten. Eine darüberhinausgehende Sensitivität wie in Abbildung 11 läßt sich bei diesem pH nicht feststellen.

Aus Abbildung 12 ersieht man, daß die Radikalbildung erst mit Gabe von Antimycin A zunimmt (verzögerte Abklingreaktion). Die Kombination von Antimycin A und CCCP als Entkoppler führt zu dem ursprünglichen Basiswert, der durch CCCP-Gabe festgelegt ist. Demgegenüber erhöht Antimycin A allein die Radikalbildung. Die damit nicht korrelierte LPO (Tab. 6) scheint auf einen endogenen Radikalfänger nach dem Antimycin A-Block hinzuweisen.

Zugabe von KCN führt zu einer erheblich verzögerten Abklingreaktion. Es muß hier allerdings davon ausgegangen werden, daß das Cyanid-Ion selbst in der Lage ist, mit dem Luminol zu reagieren, so daß die Chemilumineszenz der Radikalbildung überdeckt wird (1,4 Addition von CN^-). Wird das BM stärker alkalisch gemacht und das Lumac-Reagenz eingesetzt, so lassen sich einige dynamische Veränderungen in der Atmungskette selbst beobachten (Abb. 11).

Zunächst gilt, daß Gabe von Antimycin A zu einer verzögerten Abklingreaktion führt. CCCP-Zusatz dagegen bedingt die schnellste Abklingreaktion, die auf dem tiefsten Niveau endet. Katalase ist in der Lage, dieses Niveau noch etwas abzusenken. Diese Tatsache könnte auf Beteiligung von H_2O_2 hindeuten. Rotenon kann nach Antimycin A-induzierter Chemilumineszenz zu einer leichten Erhöhung führen, die durch CCCP deutlich unter das Antimycin A-Niveau abgesenkt wird, ohne das niedrige Niveau der Abklingreaktion mit CCCP allein zu erreichen. Ohne Zusatz stellt sich ein Niveau ein, das durch das Kreuz (x) angedeutet werden soll. Beide sich oben und unten vom Kreuz befindlichen Kurven sollen die Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Reihenfolge der Reagenzzugabe darstellen. Im ersten Fall führt Antimycin A zu einer leichten Erhöhung und darauffolgendes CCCP zu einer leichten Erniedrigung der Chemilumineszenz. Im anderen Fall senkt CCCP die Lumineszenz deutlich und Antimycin A verstärkt sie wieder sehr stark.

Für KCN trifftdas oben gesagte zu: Es reagiert selbst mit Luminol und verdeckt die eigentliche Abklingreaktion. Dafür spricht auch die Unbeeinflußbarkeit durch Katalase.

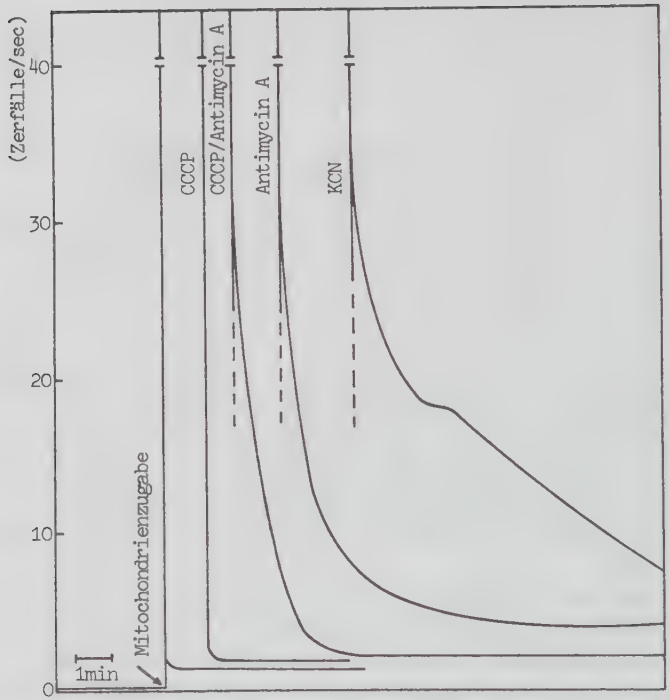


Abb. 12: Messung der Chemilumineszenz bei verschiedenen mitochondrialen Zuständen
Die Messung erfolgte nach Variante B mit 1,2mg Protein, 2,5mM Succ und dem an der Kurve bezeichneten Reagenz (s. Abb. 11). Weiter wurden zugesetzt 10µM Fe^{2+} und 1mM Luminol. Der Start erfolgte mit Zugabe von Mitochondrien.

3.2.2. LPO unter erniedrigtem Sauerstoffdruck

Die nach 2.2.3. durchgeführten Inkubationen zeigen eine Abhängigkeit der LPO von sehr niedrigen Sauerstoffdrucken wie sie in Abbildung 13 dargestellt ist.

Aus dem Vergleich der Punkte I und II und dem Wert für das endogen vorhandene MDA läßt sich schließen, daß ohne exogenes Fe^{2+}/ADP nur sehr geringe

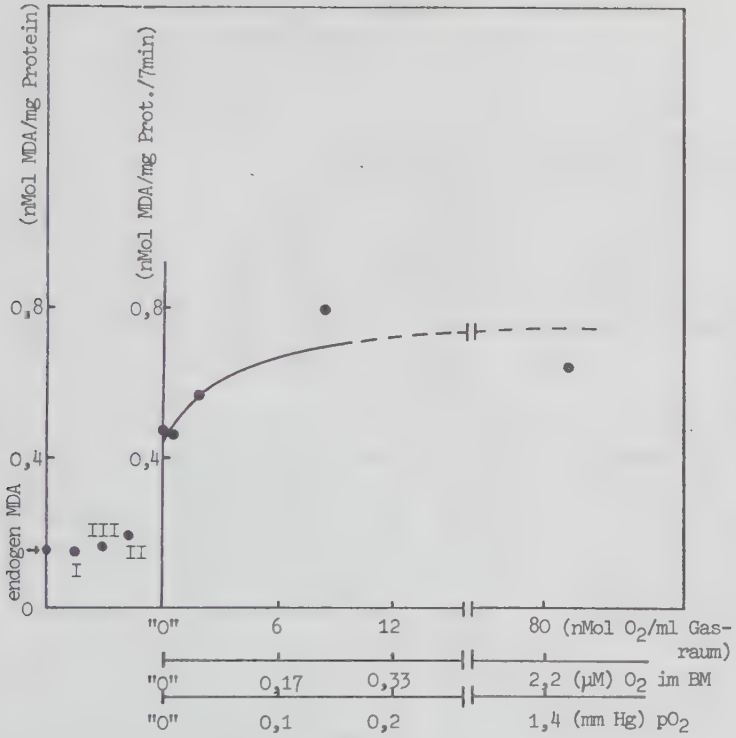
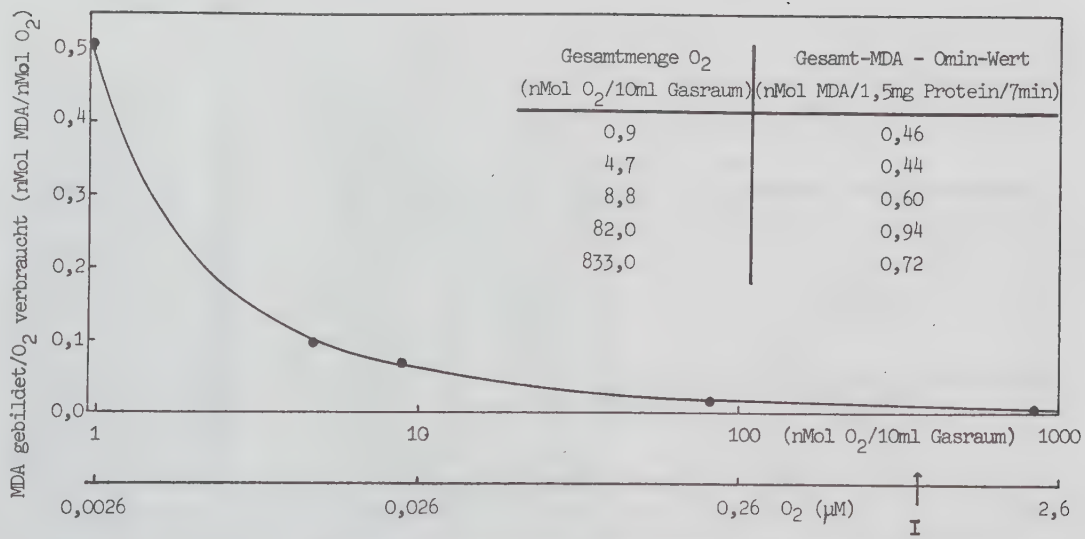


Abb. 13: Die LPO in Abhängigkeit von niedrigen O_2Konzentrationen
Beschreibung der Inkubation in den Methoden. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 1,5mg, zusätzlich 10mM Succ, 60µM ADP und 10µM Fe^{2+}. Das endogene MDA wurde durch Einspritzen von mitochondrialer Suspension in TCA bestimmt. Es bedeuten:
I: MDA nach 5min Vorinkubation ohne Fe/ADP;
II: 12min Vorinkubation ohne Fe/ADP;
III: entspricht I, dann Zugabe von Fe/ADP und sofortiges Enteiweißen.
Alle drei Inkubationen wurden unter N_2 durchgeführt.

LPO stattfindet. Erst Zugabe von Fe-Ionen mit ADP führt auch unter Stickstoff zu einem sprunghaften Anstieg der LPO, da auch der verwendete Stickstoff noch Reste von Sauerstoff enthält (etwa 0,002%). Aus diesem Grunde



Gesamtmenge O_2 (nMol O_2/10ml Gasraum)	Gesamt-MDA - 0min-Wert (nMol MDA/1,5mg Protein/7min)
0,9	0,46
4,7	0,44
8,8	0,60
82,0	0,94
833,0	0,72

Abb. 14: Die LPO in Abhängigkeit vom O_2 Angebot

Die Daten sind aus der Abbildung 13 entnommen. Die Ordinate gibt die produzierte Menge MDA an (korrigiert um das endogene MDA) im Verhältnis zur verbrauchten O_2 Menge.

I: K_M-Wert der Cytochrom c-Oxidase: 1µM

ist der Abszissenwert mit "O" bezeichnet. Die Zunahme bei III relativ zu I und Direktenteiweißung zeigt evtl. vorhandene endogene Hydroperoxide an, die mit Fe^{2+}-Ionen zu MDA zerfallen sollen (54). Die gestrichelt gezeichnete Kurve soll andeuten, daß über den exakten Kurvenverlauf keine Klarheit herrscht. Denkbar ist es, daß die LPO tatsächlich wieder leicht abfällt bis zu dem Punkt, an dem die O_2-Konzentration zu maximaler Atmungsrate der Mitochondrien führt. Aus der bekannten Atmungsrate (hier etwa 27nMol O_2/mg Protein/min für die Status 4-Atmung) und der Abhängigkeit der Atmung von der O_2-Konzentration (23) läßt sich die tatsächlich verbrauchte Menge an O_2 extrapolieren (der K_M-Wert der Cytchrom c-Oxidase ist etwa 1µM für O_2). Es zeigt sich, daß außer bei der höchsten O_2-Konzentration mindestens 90% des im Gasraum vorhandenen O_2 verbraucht werden.

Abbildung 14 zeigt nun den relativen Anstieg der LPO pro tatsächlich verbrauchter O_2-Menge bei verschiedenen vorgegebenen O_2-Konzentrationen. Aus dem Verlauf der Kurve erkennt man, daß der Sauerstoff über zwei Mechanismen verbraucht wird: Zum einen ist es die mitochondriale Atmung, die aber mit abnehmender O_2-Konzentration abnimmt. Der andere Mechanismus, der mit Abnahme der Atmung immer stärker ins Gewicht fällt, ist die LPO (Weiteres s. Theoretischer Teil).
Hingewiesen werden soll noch auf die Tatsache, daß die in Abbildung 13 für die mitochondriale, wässrige Phase angegebenen Konzentrationen theoretische Gleichgewichtskonzentrationen sind, die praktisch nicht ganz erreicht werden dürften. Darüberhinaus wird für die LPO nur der Sauerstoff wirksam, der in der lipophilen Phase der Membran gelöst ist. Die Membran allerdings vermag O_2 bis zum 10fachen der umgebenden wässrigen Phase zu konzentrieren (persönliche Mitteilung Dr. E. Lengfelder, München).

3.3. Bestimmung weiterer Parameter nach chronischen Alkoholgaben

3.3.1. Messung der Protonenpermeabilität

Wie man anhand der Abbildung 15 sieht, folgt der Gabe eines Entkopplers zu atmungsgehemmten Mitochondrien (Antimycin A und Oligomycin) ein starker Protoneneinstrom. Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 und die Gesamtmenge an eingeströmten Protonen Δx kann man durch Eichung bestimmen. Beide Parameter sind miteinander korreliert.

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeit schwanken stark (Abb. 16); sie sind aber für jeweils unterschiedlich vorbehandelte Mitochondrien

konsistent:

So ist die v_o für Mitochondrien von chronisch mit Alkohol vorbehandelten männlichen Ratten immer kleiner als für die Kontrollen. Dies gilt für die Standard- als auch für die Palmindiät; allerdings ist sie unter letzterer noch wesentlich verringert. Daraus kann geschlossen werden, daß Alkohol Veränderungen in der Membran hervorruft, die in ihren Auswirkungen der Verfütterung von Palmin (anstelle von Sojaöl) gleichkommen. Die Gesamtmenge (Δx) der eingeströmten Protonen gibt ihr unterschiedliches chemisches Potential über die Mitochondrienmembran wider und ist sicher ein Maß für die Energetisierbarkeit der Mitochondrienmembran. Niedrige Δx-Mengen be-

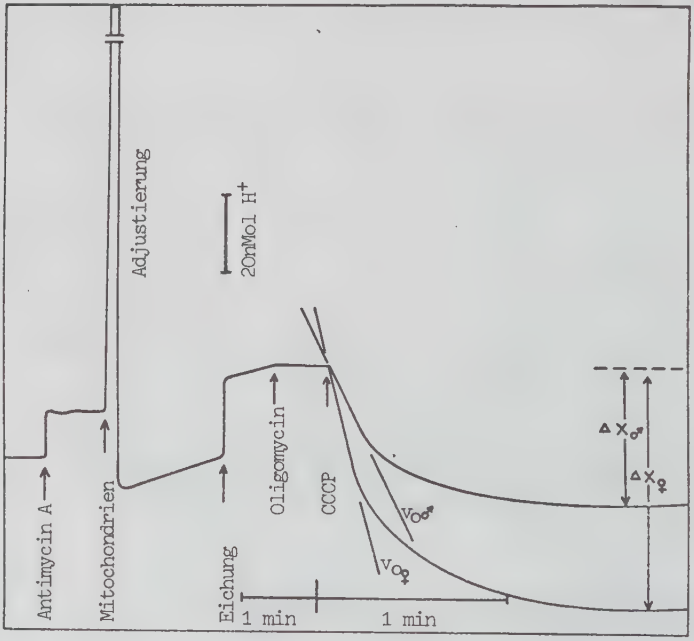


Abb. 15: Bestimmung der Protonenpermeabilität an mitochondrialen Membranen

Die Messung wurde in 2,4ml 130mM KCl und 1mM MOPS-Puffer, pH 7,2, bei 25°C vorgenommen. Zugegeben wurden in der angegebenen Reihenfolge 2µg Antimycin A, 3mg Protein, 20nMol H^+zur Eichung, 5µg Oligomycin und 2,1µM CCCP. v_o bezeichnet die Anfangsgeschwindigkeit des H^+-Einstromes, Δx die Gesamtmenge der eingeströmten Protonen.

ruhen dann auf geringer Energetisierungsfähigkeit durch hohe Protonenleckpermeabilität der Membran. Die Protonenleckpermeabilität und die Anfangsgeschwindigkeit v_0 sind also umgekehrt korreliert.

Die Protonenleckpermeabilität ist unter Alkoholeinwirkung erhöht. Sie ist weiter verstärkt bei Palmindiät kombiniert mit chronischen Alkoholgaben. Damit konsistent ist die Entwicklung des ACR nach Alkohol und Palmindiät (s. 3.1.2.1.).
Für Mitochondrien weiblicher Ratten stellt sich allerdings im Gegensatz zu den beobachteten niedrigeren ACR-Werten heraus, daß deren Protonenleckpermeabilität bei den angewandten Versuchsbedingungen geringer und damit Δx größer ist, als bei Mitochondrien männlicher Ratten. Allerdings läßt sich auch hier nach chronischen Alkoholgaben eine Zunahme der Permeabilität feststellen. Die Palmindiät hat nur einen geringen Einfluß. Dies ist wieder konsistent mit der Entwicklung des ACR (s.3.1.2.2.).

Erklärungsschwierigkeiten macht allerdings die oben schon angesprochene Tatsache, daß die Mitochondrien weiblicher Tiere ohne Energiezufuhr (Hemmung der Atmung mit Antimycin A) den Protonengradienten länger aufrecht zu erhalten vermögen als die männlicher Tiere. Zugabe von CCCP führt dann zu einer höheren Influxgeschwindigkeit im Vergleich zu Mitochondrien männlicher Ratten. Sie ist wieder positiv korreliert mit der Menge der maximal eingeströmten Protonen (Abb. 16, unterer Teil).

Die Tatsache einer verringerten Protonenpermeabilität bei Mitochondrien weiblicher Tiere konnte auch bei Mäusen (Stamm: MNRI) festgestellt werden (nicht gezeigt).

3.3.2. Messung von Calciumaufnahme und -wiederabgabe

Mitochondrien sind in der Lage, große Mengen Calcium in einem energieabhängigen Prozeß über Vermittlung von Transportproteinen aufzunehmen (69). Durch reversible Ca^{2+}-Aufnahme und -abgabe wirken sie für das zytosolische Ca^{2+} als Puffer. Beide Prozesse werden über eine Vielzahl von Faktoren gesteuert (70).

3.3.2.1. Titration von Mitochondrien mit Calcium

Abbildung 17 zeigt, daß die Konzentrierungsfähigkeit für Ca^{2+} nach chronischen Alkoholgaben für Lebermitochondrien männlicher Ratten unter Standarddiät verringert ist ($p < 0{,}01$).

Verfütterung der Palmindiät erniedrigt diese auch ohne Alkohol auf gleiche Werte ($p < 0,01$). Dies korreliert mit den gemessenen ACR (s.Tab. 2), die bei energieabhängigen Prozessen auch als Maß des zur Verfügung stehenden elektrochemischen Potentials angesehen werden können.

Mitochondrien von weiblichen Ratten zeigen keine deutliche Abhängigkeit der Aufnahmefähigkeit für Ca^{2+} von der Diät. Die maximale Ca^{2+}-Konzentration liegt wie bei den Kontrollen der Mitochondrien männlicher Tiere bei etwa 200nMol Ca^{2+}/mg Protein (in Anwesenheit von 1,5mM Phosphat und etwa 2,5mM K^+). Eine Ausnahme tritt hier bei weiblichen Ratten unter Palmindiät und chronischen Alkoholgaben auf. Die konzentrierbare Ca^{2+}-Menge erhöht sich auf etwa 300nMol Ca^{2+}/mg Protein!

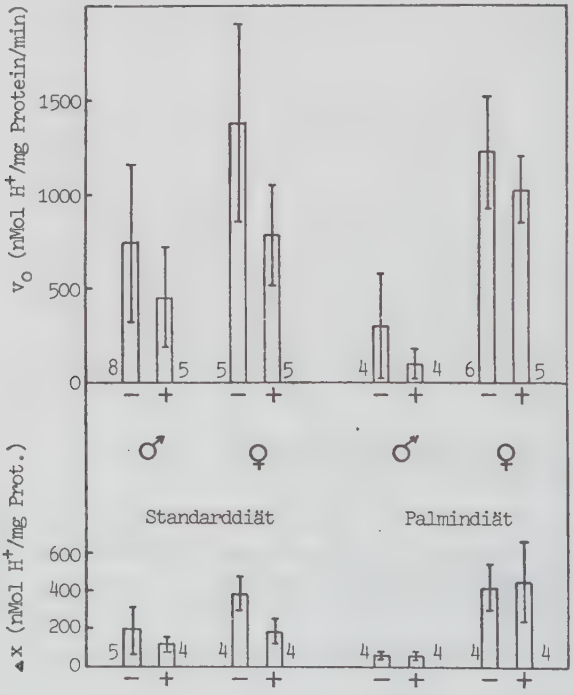


Abb. 16: Protonenpermeabilität an mitochondrialen Membranen nach Verfütterung verschiedener Diäten mit (+) und ohne (-) chronische Alkoholgaben
Die Werte wurden aus Kurven entsprechend Abbildung 15 gewonnen.

Insgesamt gesehen verändern weibliche Mitochondrien ihre Parameter der anergieabhängigen Ca^{2+}-Aufnahme nicht negativ, weder nach Palmindiät noch unter chronischen Alkoholgaben, was konsistent mit der beobachteten Protonenpermeabilität (s.3.3.1.), aber wieder im Gegensatz zum ACR ist.

3.3.2.2. Calciumaufnahme und -wiederabgabe nach Lanthan

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen, daß ohne Substrat nur eine geringe Aufnahme von Ca^{2+} in Mitochondrien stattfindet; dargestellt als (■).

Nach Succinatgabe stellt sich abhängig von der vorgegebenen Ca^{2+}-Menge eine intramitochondriale Gleichgewichtskonzentration ein. Diese ist das Resultat aus Aufnahme und Wiederabgabe von Ca^{2+}, wobei erstere stark überwiegt. Es fällt auf, daß Alkohol und Palmindiät zu einer

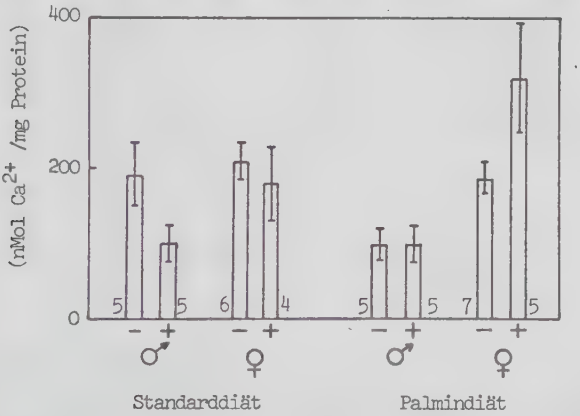


Abb. 17: Titration von Mitochondrien mit Calcium nach unterschiedlicher Vorbehandlung (s. Abb. 16)
Die Mitochondrien wurden in 1ml BM mit 5µM Rotenon und 2mM Succinat inkubiert. Es wurden sukzessiv 2µl 10mM $CaCl_2$-Lösung bis zur maximalen Stimulation der mitochondrialen Atmung (Bestimmung mit Hilfe der Sauerstoffelektrode) hinzugefügt.

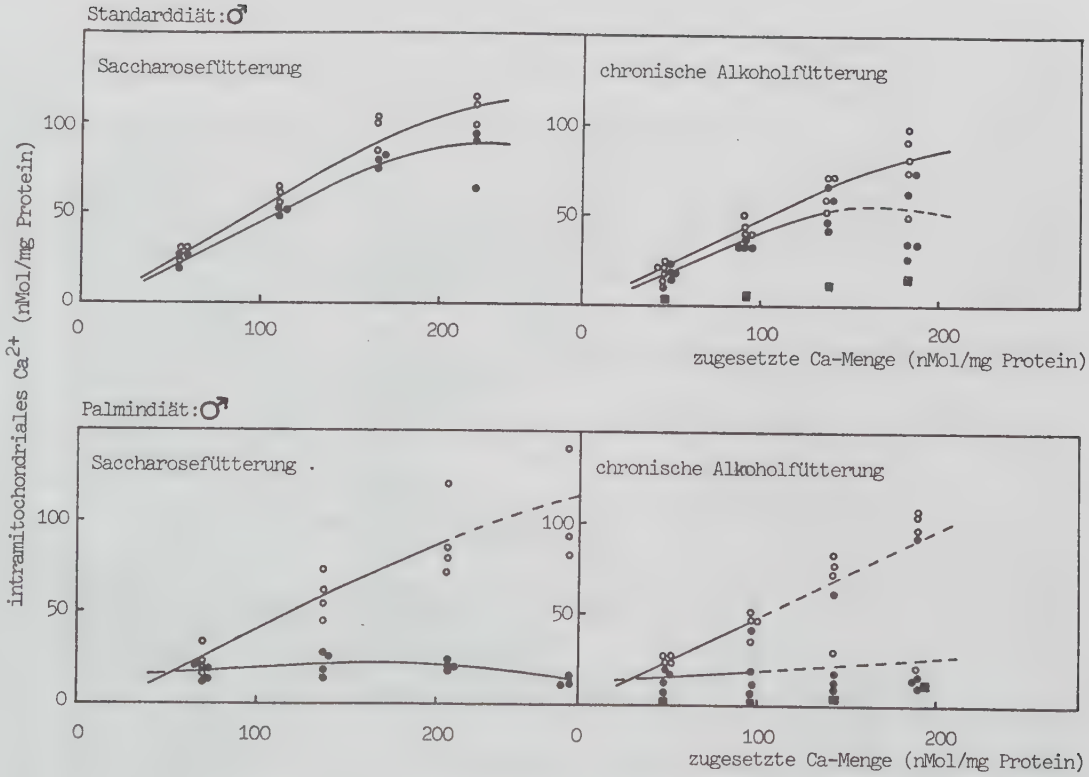


Abb. 18: Die Calciumaufnahme und -wiederabgabe unterschiedlich vorbehandelter Mitochondrien männlicher Ratten (Legende s. Seite 54)

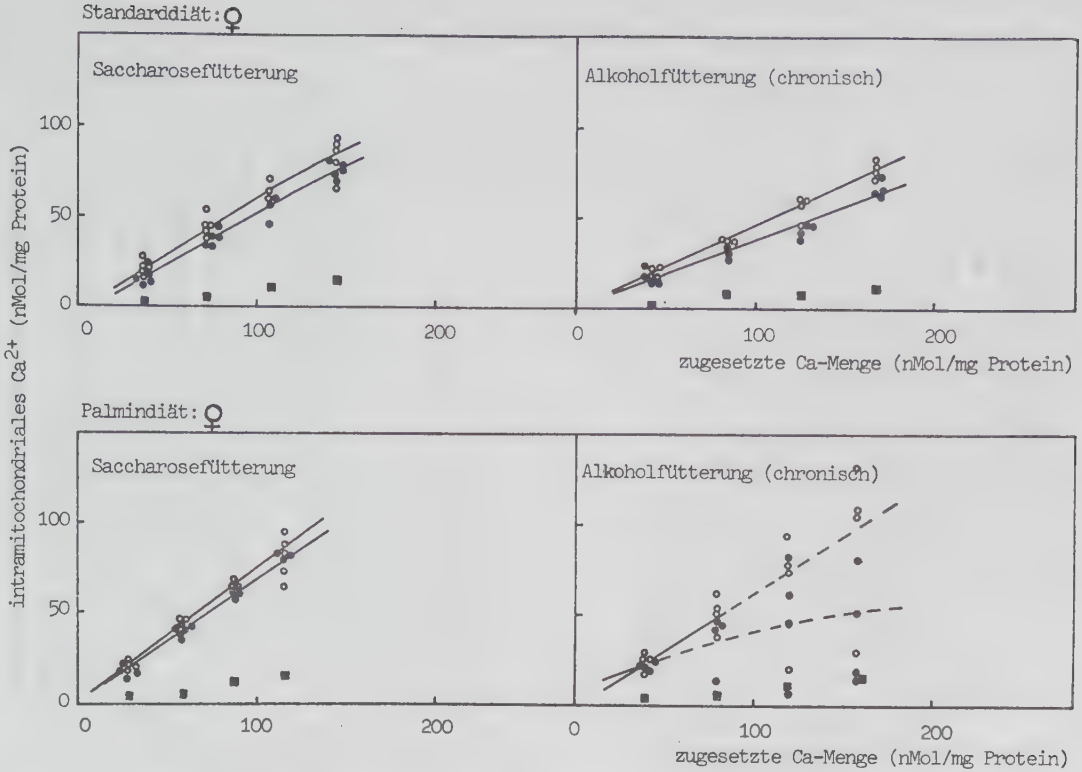


Abb. 19: Die Calciumaufnahme und -wiederabgabe unterschiedlich vorbehandelter Mitochondrien weiblicher Ratten (Legende s. Seite 54)

Legende für die Abbildung 18 und 19:

Die Inkubationen wurden in 1,5ml 250mM Saccharose, 10mM MOPS, 2,7µM Rotenon, 2mM $MgCl_2$, 3,25mM K^+ und 2mM Phosphat, pH 7,4, mit 1,2mg mitochondrialem Protein durchgeführt: Nach Vorinkubation wurden nach 13 und 14min je eine Probe entnommen (beide wurden gemittelt und als Ca-Aufnahme ohne Substrat definiert: entspricht(■)in den Abbildungen). Nach 15min wurde Succinat hinzugefügt (3,3mM) und zwei nach 18 und 19min gezogene Proben ergaben als gemittelte Werte die Ca-Aufnahme mit Substrat: entspricht (o——o) in den Abbildungen. Bei 20min folgte die Zugabe von La^{3+} (10µM), der nach 26 und 27min eine erneute Entnahme von zwei Proben folgte, die gemittelt als Ca-Aufnahmefähigkeit nach La^{3+} definiert wurden (entspricht (●——●) in den Abbildungen). Die weitere Bestimmung des intramitochondrialen Ca^{2+} geschah, wie unter 2.2.2.3 beschrieben.

starken Streuung der Meßwerte beitragen, so daß der Verlauf der Kurven unsicher wird (gestrichelt dargestellt).

Lanthan ist als kompetitiver Hemmer der energieabhängigen Ca^{2+}-Aufnahme in die Mitochondrien bekannt. Zusatz von La^{3+} erscheint deshalb geeignet, die Abgabe von Ca^{2+}, deren Energieabhängigkeit unbekannt ist, zu beobachten. Bei Mitochondrien männlicher Ratten (Abb. 18) zeichnet sich nach chronischen Alkoholgaben bei der Standarddiät unter hohem Ca^{2+}-Angebot eine Zunahme des Effluxes von Ca^{2+} ab. Diese ist verstärkt nach Palmindiät, ob mit oder ohne Alkoholvorbehandlung. Daraus kann geschlossen werden, daß unter diesen Bedingungen die Membran für Ca^{2+} permeabler geworden ist. Dies wurde auch bei in vitro Gaben von Alkohol beobachtet (71). Nur die kompensatorisch wirkende hohe Aufnahmerate ermöglicht überhaupt eine Konzentrierung von Ca^{2+} in den Mitochondrien. Hemmung der Aufnahme mit La^{3+} führt bei der Standarddiät nach Alkohol (bei hohen Ca^{2+}-Mengen) und bei Palmindiät allgemein zur sofortigen Wiederabgabe (leakage).

Mitochondrien weiblicher Ratten (Abb. 19) zeigen das oben beschriebene Verhalten nur nach Kombination von Palmindiät mit chronischen Alkoholgaben; allgemein also einen verringerten Calciumefflux.

3.3.2.3. Endogene Calciummengen in Mitochondrien

Nach Isolierung der Mitochondrien (s.2.2.1.) findet man endogen gebundenes Ca^{2+} vor.

Nach Abbildung 20 ist dieses bei Palmindiät bis auf das Doppelte erhöht. Aus dem endogenen Ca^{2+}-Anteil unter Bedingungen der Standarddiät kann man schließen, daß dieser Anteil nicht zu einer Verminderung des ACR nach Alkohol beiträgt, wie dies nach chronischem Alkoholgenuß auch für Mitochondrien weiblicher Tiere festgestellt wurde. Mobiles Ca^{2+}, das durch Leakage verlorenging (s. Abb. 18 und 19), müßte unter Energieverbrauch konzentriert werden, d.h. es beschleunigte die Atmung. Beschleunigte Atmung im kontrollierten Status aber resultierte in einer Erniedrigung des ACR.

Die gefundenen Ca^{2+}-Mengen unter Kontrollbedingungen entsprechen denen von Binet und Volfin (72).

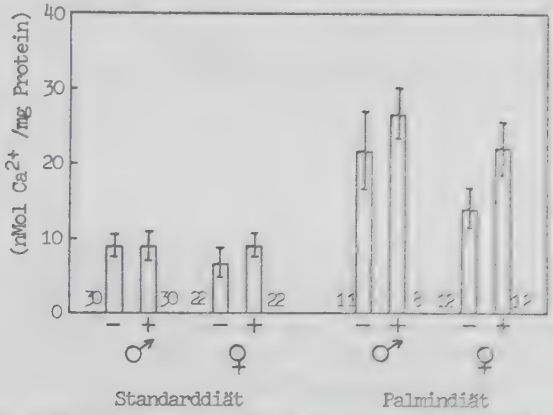


Abb. 20: Endogene Calciummengen in Rattenlebermitochondrien nach Verfütterung von Standard- und Palmindiät mit (+) und ohne (−) chronische Alkoholgaben

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Atomabsorption bei 422,7 nm Wellenlänge. Die mitochondrialen Suspensionen wurden naß verascht und die Lösung wurde nach entsprechender Verdünnung gemessen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve.

3.3.3. Kaliumaufnahme und -wiederabgabe

Der Ionophor Valinomycin erhöht die K^+-Permeabilität der Mitochondrienmembran (Abb. 21). Die Umverteilung von K^+ ist energieabhängig. Die Aufnahme ist um so größer, je besser die Membran durch Atmung energetisiert werden konnte. Aber auch die K^+-Abgabe wird durch Valinomycin beschleunigt. Sie verläuft passiv nach dem Konzentrationsgradienten. Mitochondrien männlicher Ratten, die nur mit der Standarddiät gefüttert wurden, zeigen entsprechend ihrer hohen Energetisierbarkeit (beurteilt nach dem gefundenen ACR) eine ausgeprägte Fähigkeit, K^+ zu konzentrieren. Chronische Alkoholgaben, sowie Palmindiät, führen zu einer deutlichen Abnahme der K^+-Kumulation. Zugabe von Oligomycin, einem Hemmer der mitochondrialen ATPase, verringert die intramitochondriale K^+-Menge nur unter Kontrollbedingungen (Saccharoseverfütterung) mit der Standarddiät, weniger deutlich unter den gleichen Bedingungen bei Palmindiät.

Bei Mitochondrien weiblicher Ratten ist das Bild wesentlich einheitlicher. Hier führt Valinomycin zwar auch zu einer Zunahme der K^+-Konzentration in den Mitochondrien, aber eine Abhängigkeit von Diät und chronischen Alkoholgaben ist nicht mehr erkennbar.

3.3.4. Membranpotential

Das beobachtete Membranpotential ist relativ niedrig, was an dem zusätzlichen Vorhandensein von 3,25mM K^+ (in Verbindung mit Valinomycin) in der Inkubationslösung liegt: Trotzdem läßt sich aus Tabelle 12 ersehen, daß bei der Standarddiät ein Absinken des Membranpotentials nach chronischen Alkoholgaben bei Männchen festgestellt werden kann (Vergleich von a mit b). Mitochondrien von weiblichen Ratten, die im Vergleich zu männlichen keine Abnahme des Membranpotentials zeigen (Vergleich von a mit c), besitzen nach chronischer Alkoholvorbehandlung sogar ein höheres Potential als ohne Alkohol (Vergleich c mit d).

Bei Verfütterung der Palmindiät sinkt das Membranpotential im Vergleich zur Standarddiät mit und ohne Alkohol signifikant ab. Eine Verringerung der Arbeitsfähigkeit der Membran ($\triangleq$ einer Verringerung des elektrochemischen Potentials) ist als Ursache anzunehmen.

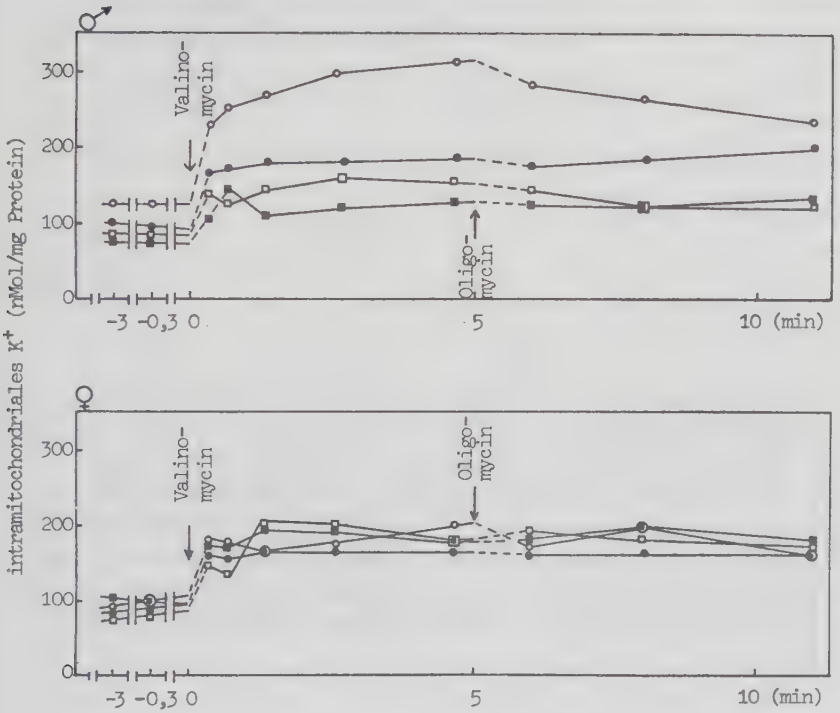


Abb. 21: Kaliumaufnahme und -wiederabgabe bei Lebermitochondrien männlicher und weiblicher Ratten

Die Inkubationen wurden in 2ml 250mM Saccharose, 10mM MOPS, 2,5mM Succ, 2mM $MgCl_2$, 3,25mM K^+ und 2mM Phosphat, pH 7,4, mit 5mg mitochondrialem Protein durchgeführt: Nach 10min Vorinkubation wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen (bei -3 und -0,3min). Gestartet wurde durch Zugabe von Valinomycin (0,5µg). Es folgten mehrere Probenentnahmen und nach 5min Zugabe von Oligomycin (1µg). Die angegebenen Meßpunkt sind Mittelwerte aus 4-6 Einzelbestimmungen verschiedener mitochondrialer Suspensionen. Es bedeuten: (o —— o) Standarddiät und Saccharosefütterung, (● —— ●) Standarddiät und chronische Alkoholgaben, (▫ —— ▫) Palmindiät und Saccharose, (■ —— ■) Palmindiät und Alkohol.

♂ Saccharose	♂ chronisch EtOH	♀ Saccharose	♀ chronisch EtOH
Standarddiät:			
-84,5±1,3 (3)[a]	-78,5±2,9 (4)[b]	-81,6±2,6 (8)[c]	-91,5±4,1 (6)[d]
Palmindiät:			
-63,8±5,6 (4)[e]	-72,0±10,9(3)[f]	-71,1±2,2 (4)[g]	-71,5±2,5 (4)

ab : $p < 0,05$
ac : n.s.
ae : $p < 0,01$
bf : n.s.
eg : n.s.
cd : $p < 0,001$
cg : $p < 0,001$

Tab. 12: Das Membranpotential nach Fütterung verschiedener Diäten mit und ohne chronische Alkoholgaben
Alle Zahlenangaben in (mV). Die dargestellten Werte wurden aus den Mittelwerten von je zwei Parallelinkubationen errechnet. Die Inkubation setzte sich aus 500µl des Mediums wie in Abb. 21 beschrieben, zusammen. Hinzu kamen 0,5µg Valinomycin, 10µl $^{3}H_2O$, 2µl ^{14}C-Inulin, 5mM Succ, 0,1mM RbCl und 20µl ^{86}Rb-RbCl. Gestartet wurde mit 1,2mg mitochondrialem Protein. Nach 10min wurde ein Aliquot entnommen und nach 2.2.2.3. aufgearbeitet.

3.3.5. Atmungsraten von Rattenlebermitochondrien

3.3.5.1. Atmungsraten nach chronischen Alkoholgaben

	♂ N=25			♀ N=10		
	Saccharose	EtOH	Veränderung um (±%)	Saccharose	EtOH	Veränderung um (±%)
Basisatmung:	6,0	9,0	+50	9,0	11,4	+25
Status 4-Atmung (Succ):	17,1	16,5	-3	32,7	30,0	-8
Veränderung um (+%):	+190	+80		+260	+160	
Status 3-Atmung (Succ):	75,3	47,1	-38	119,1	112,2	-6
Veränderung um (+%):	+340	+180		+260	+270	
F:	4,4	2,9		3,6	3,7	
Status 4-Atmung (RHOB):	7,2	10,5	+50	16,8	16,8	0
Veränderung um (+%):	+17	+15		+84	+50	
Status 3-Atmung (RHOB):	42,0	37,5	-11	67,2	69,0	+3
Veränderung um (+%):	+480	+266		+300	+310	
F:	5,8	3,6		4,0	4,1	

Tab. 13: Atmungsraten von Mitochondrien männlicher und weiblicher Ratten ohne und mit chronischer Alkoholgabe

Die Atmungsraten sind berechnet als (nMol O_2/mg Protein/min). Die angegebenen Prozentsätze sind aus den nicht gerundeten Atmungsraten berechnet. Als Status 4-Atmung gilt hier Atmung mit Succ vor ADP-Gabe. Es bedeutet "F" das Verhältnis von Status 3- zu Status 4-Atmung, das nach der Definition nicht dem ACR entspricht, ihm aber sehr nahe kommt (s. 2.2.4.1.). Die Messungen wurden mit 3mg mitochondrialem Protein durchgeführt.

Chronische Alkoholgaben führen bei Mitochondrien männlicher und weiblicher Ratten zu einer Stimulierung der Basisatmung (endogenes Substrat).

Wird als exogenes Substrat Succ angeboten, so wird bei Mitochondrien nichtvorbehandelter Tiere beiderlei Geschlechts starke Atmungsstimulation erreicht. Vergleicht man die Absolutwerte, so zeigt sich allerdings, daß Mitochondrien männlicher Tiere nur halb so schnell atmen wie die der weiblichen.

Wird schließlich durch ADP-Zugabe die Status 3-Atmung ausgelöst, scheint diese nach chronischen Alkoholgaben bei Mitochondrien männlicher Tiere gehemmt zu sein. Unter den gleichen Bedingungen zeigen Mitochondrien weiblicher Ratten nach Alkohol die Werte der Kontrolle, die, absolut gesehen, wesentlich höher liegen als bei den männlichen Kontrollen.

Die Status 3-Atmung scheint nach chronischen Alkoholgaben bei Mitochondrien männlicher Ratten einer Begrenzung zu unterliegen, die entweder direkt in der verringerten spezifischen Aktivität eines betroffenen Enzyms (möglicherweise Succinatdehydrogenase) oder in der veränderten Lipidumgebung zu suchen ist. Als integrales Protein könnte die Succinatdehydrogenase besonders empfindlich darauf reagieren (73). Die Abnahme des ACR (s. 3.1.2.1.) unter Alkoholeinfluß bei Mitochondrien männlicher Tiere beruht danach auf einer Hemmung der Status 3-Atmung. Bei Mitochondrien weiblicher Ratten ist sie niedriger durch erhöhte endogene und Status 4-Atmung.

Wird statt Succinat ß-Hydroxybutyrat als Substrat zugegeben, so ergibt sich nur für Mitochondrien weiblicher Ratten unter Kontroll- und Alkoholbedingungen eine Atmungsstimulation im Status 4, die einen relativen Mangel an endogenen Substraten widerspiegelt. Die Status 3-Atmung erreicht für Mitochondrien beider Geschlechter bei Kontrollen und nach Alkohol etwa gleiche Werte, wobei allerdings die absoluten Atmungsraten bei Mitochondrien weiblicher Tiere immer wesentlich über den Atmungsraten der männlichen Ratten liegen. Die Abnahme des ACR nach chronischen Alkoholgaben bei Mitochondrien männlicher Tiere beruht hier, wie bei den Mitochondrien weiblicher Tiere, ausschließlich auf einer erhöhten Atmung im kontrollierten Zustand. Chronische Alkoholgaben scheinen die NADH-abhängige Atmung, soweit sie ßHOB betrifft, im Gegensatz zur flavinabhängigen kaum zu hemmen.

3.3.5.2. Abhängigkeit der mitochondrialen Atmung von NADH und Cytochrom c

Für die innere Mitochondrienmembran ist NADH normalerweise nicht permeabel. Wenn NADH-Zusatz zu Mitochondrien trotzdem zu einer Atmungsstimulation führt, (Tab. 14) dann kann das NADH nicht über die am Anfang der Atmungskette befindliche NADH-Dehydrogenase oxidiert worden sein (dies ist auch für den Fall

	CCCP/ Rotenon/ Antimycin A	ibid. + NADH	Veränderung um (%)	ibid. + Cytochrom c	Veränderung um (%)
♂ Saccharose N=9	8,2±5,2	18,4±6,4[a]	110	112,6±47,8[c]	510
EtOH(chronisch) N=6	5,9±3,4	7,0±1,7[b]	20	42,4±15,0[d]	510
♀ Saccharose	5,1±2,9	7,4±3,2[e]	40	82,9±39,3[g]	1030
EtOH(chronisch)	3,7±0,8	7,7±5,1[f]	110	88,9±22,4[h]	1050

ab : $p < 0,01$
cd : $p < 0,01$
ef : n.s.
gh: n.s.

Tab. 14: Stimulation der mitochondrialen Atmung durch NADH und Cytochrom c nach CCCP, Rotenon und Antimycin A

Die Meßwerte sind angegeben als Atmungsraten in (nMol O_2/mg Protein/min). Die Prozentzahlen sind gerundet. Gemessen wurde im BM mit 0,6mg mitochondrialem Protein und 4µM CCCP, 2µM Rotenon, 5µg Antimycin A, 0,4mM NADH, 100µM Cytochrom c.

einer geringen Membranpermeabilität durch Zusatz von Rotenon und Antimycin A ausgeschlossen), sondern es bleibt nur der Weg über die NADH-Cytochrom c-Dehydrogenase. Dieses Enzym befindet sich in der äußeren Mitochondrienmembran. Da die äußere Membran kein Hindernis für NADH darstellt, werden die Reduktionsäquivalente vom NADH auf einen Redoxpartner übertragen, der den Intermembranraum der Mitochondrien überwinden und in das terminale Stück der Atmungskette Reduktionsäquivalente übertragen kann. Die einzige, leicht ablösbare Atmungskettenkomponente ist Cytochrom c. Für die Beteiligung von Cytochrom c spricht auch die Hemmbarkeit mit KCN (nicht gezeigt).

Nur Mitochondrien männlicher Ratten unter Kontrollbedingungen zeigen eine starke NADH-abhängige Atmung (Tab. 14), wenn man die absoluten Atmungsraten betrachtet. Die relative Stimulation der Atmung ist bei Mitochondrien von mit Alkohol vorbehandelten Männchen am geringsten, was möglicherweise auf einen Mangel an Cytochrom c zurückgeführt werden kann (Tab. 15). Zusatz von Cytochrom c erhöht die Atmung von mit Alkohol chronisch vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Mitochondrien männlicher Tiere um gleiche Prozentsätze (gilt auch für Mitochondrien weiblicher Ratten), aber die Absolutatmung beträgt nach Alkohol nur 1/3 der Kontrolle. Mitochondrien weiblicher Ratten zeigen in beiden Fällen etwa gleiche Atmungsraten.
Wie man aus der Tab. 14 erkennt, sind die den mitochondrialen Suspensionen zugegebenen Mengen an Cytochrom c im Vergleich zum endogen vorhandenen Cytochrom c (Tab. 15) sehr hoch. Es zeigte sich, daß geringe Zugaben an Cytochrom c die Atmung nicht beeinflußten. Höhere Konzentrationen bewirkten eine konzentrationsabhängige Stimulation der Atmung. Diese war nicht quantifizierbar, so daß die hier zugegebene Menge an Cytochrom c so gewählt wurde, daß sie zu maximaler Atmung führte.

Zugabe von Cytochrom c zu mitochondrialen Suspensionen ohne NADH, aber mit Succinat als exogenem Substrat führte nur zu einer Atmungsstimulation von 20% (nicht gezeigt). Das bedeutet, daß Cytochrom c unter diesen Bedingungen nicht begrenzender Faktor der Atmung ist.

Auch nach Substraten wie Ascorbinsäure und TMPD, die bekanntermaßen die Atmung erhöhen, führt Cytochrom c zu einer nochmals gesteigerten Atmung (nicht gezeigt). Ascorbinsäure und TMPD bringen dabei ihre Reduktionsäquivalente über Cytochrom c in die Atmungskette ein, was vergleichbar der Atmung mit NADH wäre (Tab. 14).

Die Tabelle 15 zeigt schließlich die in Mitochondrien nach der Isolation gefundenen Cytochrom c-Mengen. Für Mitochondrien männlicher Ratten scheint sie sich nach chronischen Alkoholgaben auf Werte zu reduzieren, die bei Mitochondrien weiblicher Ratten gefunden werden. Bei diesen ist eine Differenzierung nach der Art der Vorbehandlung nicht möglich.

	Saccharose ♂ N=7	EtOH	Saccharose ♀ N=7	EtOH
Cytochrom c-Menge (nMol/mg Protein)	0,60±0,09	0,43±0,08	0,38±0,06	0,42±0,06
Reduktionsgrad (%)	18,5	16,0	24,0	18,5

Tab. 15: Die Menge an Cytochrom c in Rattenlebermitochondrien mit und ohne chronische Alkoholgaben und seine Reduktion durch zugegebenes NADH nach Antimycin A
Cytochrom c wurde in 3ml BM mit 2,4mg mitochondrialem Protein nach Oxidation durch Zugabe von 2mM Succinat und 5µg Antimycin A und maximaler Reduktion durch Dithionit bestimmt.

Der angegebene Reduktionsgrad bezieht sich auf die Reduktion von Cytochrom c nach NADH-Zugabe (0,4mM), nachdem es zuvor mit Succ und Antimycin A maximal oxidiert worden war. Die Messung erfolgte im Doppelwellenlängenphotometer bei 550 und 540 nm (s. 2.1.4.).

Die Meßergebnisse könnten darauf hindeuten, daß bei der Isolation je nach Herkunft und Vorbehandlung unterschiedliche Mengen an Cytochrom c verloren gegangen sind. Auch dies spräche für unterschiedliche Membranen, die aufgrund ihres unterschiedlichen Aufbaus (Oberflächenladungsdichte!) Cytochrom c unterschiedlich fest binden. Über die tatsächlichen Verhältnisse in vivo wird nichts ausgesagt (s. Theoretischer Teil).

Schließlich gibt Tabelle 15 noch Auskunft über die nach NADH-Gabe erreichten Reduktionsgrade des Cytochrom c nach vorausgegangener vollständiger Oxidation. Diese sind, unabhängig von der Herkunft und der Art der Vorbehandlung, etwa gleich.

3.3.6. Körpergewicht und Energieverbrauch nach chronischen Alkoholgaben

Chronische Alkoholgaben äußern sich in einer deutlichen Gewichtsverminderung männlicher Ratten (Abb. 22) im Vergleich zu weiblichen Ratten (Abb. 23).

Auch Saccharosefütterung führt zu einem kurzzeitigen Wachstumsstillstand bei männlichen und weiblichen Ratten. Bei männlichen Ratten nimmt das Wachstum unter chronischem Alkohol nach etwa 3 Wochen wieder zu und entwickelt sich dann parallel zu den Kontrollratten, wenn auch auf niedrigem Niveau. Für weibliche Ratten beträgt die Latenzzeit nach chronischen Alkoholgaben nur wenige Tage.

Die Abnahme des Körpergewichts ist Folge der verringerten Nahrungsaufnahme. Sowohl die Verfütterung von Saccharose als auch von Alkohol führt zu einer steilen Abnahme der Energiezufuhr. Diese ist bei Saccharoseverfütterung an männliche Ratten nur von kurzer Dauer, erholt sich sehr schnell und führt zu weiterer Gewichtszunahme.
Werden die männlichen Ratten mit Alkohol gefüttert, so bleibt die Energiezufuhr lange auf niedrigem Niveau, erholt sich aber auch nach etwa 3 Wochen. Es resultiert dann eine weitere Gewichtszunahme. Im weiteren Verlauf fällt hinsichtlich der Energiezufuhr auf, daß sie unter Alkohol immer höher ist als mit Saccharose (Abb. 22). Daraus kann gefolgert werden, daß ein gewisser Anteil der zugeführten Energie nicht nutzbar gemacht werden kann und deshalb die absolut aufgenommene Menge unter Alkohol vergrößert werden muß, um den Bedarf zu decken.

Weibliche Ratten brauchen diese zusätzliche Energiemenge nicht (Abb. 23), ihre Kurven sind fast identisch. Es zeigt sich zudem, daß weibliche Ratten auch in der Anfangsphase nach Alkohol eine wesentlich höhere Nahrungsaufnahme zeigen als männliche.

Festzustellen bleibt ein gewisser kalorigener Anteil der zugeführten Energie bei männlichen Ratten nach chronischer Alkoholaufnahme. Ursache könnte die nach Alkohol verstärkte endogene Atmung sein, oder ein anderer Prozeß, der beim Alkoholabbau beteiligt ist (MEOS?), (s. Theoretischer Teil). Zu Beginn der Fütterung mit Saccharose bzw. Alkohol nehmen männliche und weibliche Ratten gleiche Mengen Festfutters zu sich. Nach längerer Alkoholexposition verschiebt sich dieses Freßverhalten: Männliche und weibliche Ratten fressen dann doppelt soviel Festfutter wie die mit Saccharose gefütterten (nicht gezeigt). Saccharoselösung wird besonders von weiblichen Ratten bevorzugt, sie trinken davon 30% mehr als männliche. Umgekehrt ist es mit der Alkohollösung; davon trinken männliche Ratten etwa 30% mehr als weibliche (nicht gezeigt). Manche der hier beobachteten Veränderungen sind deshalb vielleicht auch auf den verstärkten Alkoholkonsum bei männlichen Ratten und auf das unterschiedliche Freßverhalten zurückzuführen.

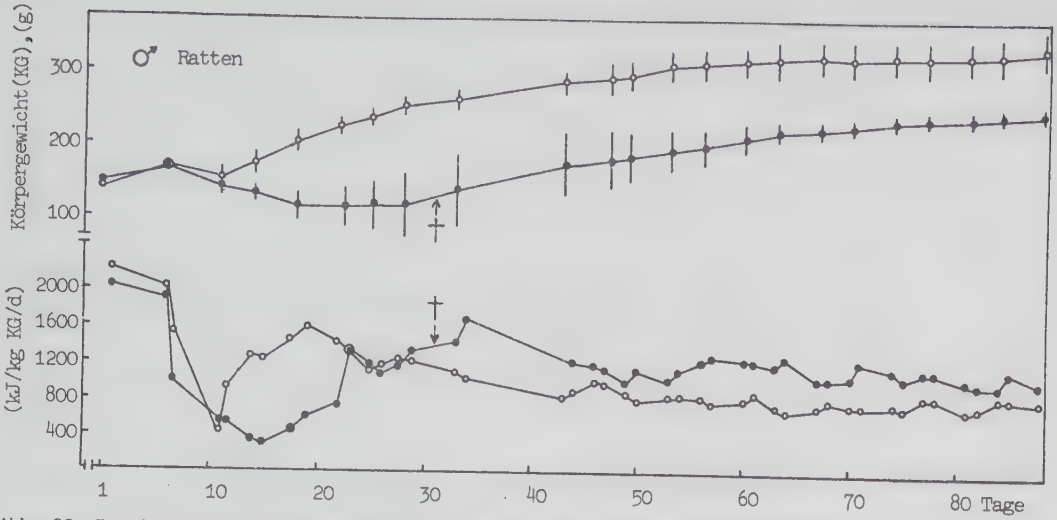


Abb. 22: Entwicklung von Körpergewicht und Nahrungsverbrauch bei männlichen Ratten
Der Energieinhalt des Festfutters Altromin^{R} wurde nach Herstellerangaben mit 13,6kJ/g angenommen, der von der Saccharoselösung mit 16,5kJ/g und von der Alkohollösung mit 13,6kJ/g. Im Fütterungsversuch waren je 6 Ratten, † bedeutet den Tod eines Tieres, (o——o) Verfütterung von Saccharose, (●——●) Verfütterung von Alkohol.

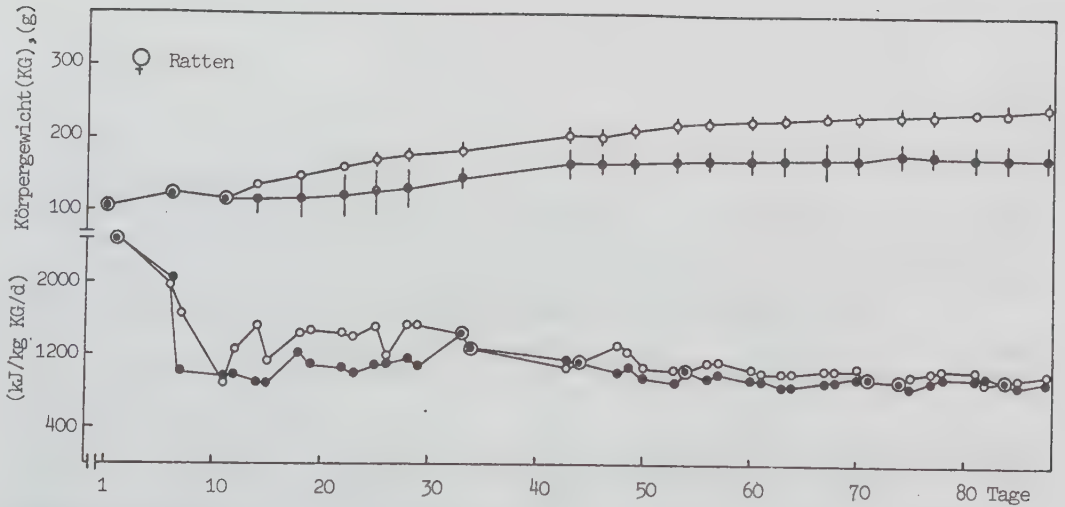


Abb. 23: Entwicklung von Körpergewicht und Nahrungsverbrauch bei weiblichen Ratten
Weitere Erklärungen s. Abbildung 22.

Wird die oben verwendete Standarddiät durch Palmindiät ersetzt, so ergibt sich ein im wesentlichen gleicher Kurvenverlauf wie in Abbildung 22 und 23. Allerdings ist die Gewichtsabnahme nach Alkohol bei männlichen Ratten noch ausgeprägter (nicht gezeigt) und etwa die Hälfte der männlichen Ratten stirbt 8-11 Tage nach Beginn der Alkoholexposition. Von den weiblichen Ratten stirbt unter diesen Bedingungen selten eine. Einer der vielen dafür geltend zu machenden Gründe könnte eine angepaßtere membranale Konstitution der weiblichen Ratte sein.

3.4. Die Fettsäurenzusammensetzung der Mitochondrienmembranen

In den Tabellen 16 und 17 sind die relativen Anteile einzelner Fettsäuren am Gesamtfettsäurenmuster der Phospholipide angegeben. Es wurde nicht zwischen Fettsäurenmuster von Außen- und Innenmembran differenziert. Wenn überhaupt, so bewirkte eine Aufschlüsselung aber nur geringfügige Änderungen für die Innenmembran, da der Anteil der Außenmembranphospholipide wesentlich weniger als 10% der Gesamtphospholipide beträgt (51). Die berücksichtigten Fettsäuren ließen sich reproduzierbar auswerten. Sie umfassen nahezu alle Fettsäuren und wurden als 100%-Wert gesetzt. Gelegentlich erschien zusätzlich vor der Arachidonsäure ein Peak der bis zur Hälfte der Arachidonsäuremenge betragen konnte. Dieser war aber unabhängig vom Futter und konnte selbst innerhalb einer Gruppe zwischen Null und dieser Menge schwanken.

Gegenüber Kontrollen unter Standarddiät bewirken chronische Alkoholgaben bei männlichen Ratten die Zunahme der kurzkettigen Fettsäuren Palmitinsäure 16:0 (33%; Prozentangaben in Klammern geben relative Veränderungen an), Palmitoleinsäure 16:1 (95%), sowie von Linolsäure 18:2ω6 (24%) (Tab. 16). Stark ab nimmt die Stearinsäure 18:0 (16%) und vor allem Arachidonsäure 20:4ω6 (30%). Alle anderen bleiben im wesentlichen unbeeinflußt. Verfütterung der Palmindiät allein oder in Kombination mit Alkohol führte bei männlichen Ratten zu gleichgerichteter Veränderung aller beobachteten Parameter. Vergleich der Tabellen 16 und 17 zeigt, daß die Palmitinsäure 16:0 und Palmitoleinsäure 16:1 mit Palmindiät ohne Alkohol etwa gleich hoch sind wie mit Standarddiät und Alkohol. Zusätzliche Gaben von Alkohol ändern daran nichts mehr. Die Linolsäure 18:2ω6 ist zwar unter Palmindiät ohne Alkohol stark verringert im Vergleich zur Standarddiät (47%), aber ihr Anteil steigt deutlich nach chronischen Alkoholgaben (54%), wie dies auch unter Standarddiät der Fall ist. Der Anteil der Arachidonsäure 20:4ω6 ist

	♂ Saccharose N:12	♂ chronisch EtOH N:10	♀ Saccharose N:8	♀ chronisch EtOH N:6
16:0	19,2±2,2[f]	25,6±9,3[a]	21,6±3,4[e,h]	19,1±3,6
16:1	2,2±0,6[f]	4,3±1,9[b]	2,4±0,5[d,i]	1,5±0,7[a]
18:0	19,8±4,4	16,6±4,9	27,8±1,7[d,g,h]	30,4±4,6
18:1ω9	8,0±1,2[f]	6,4±1,7[a]	8,3±1,7[d,i]	6,2±1,2[b]
18:1ω7	6,6±1,0	7,0±1,8	4,1±0,8[g,h]	3,8±0,8
18:2ω6	11,2±1,4[f]	13,9±5,5	6,3±0,7[g]	9,5±1,1[c]
20:4ω6	25,5±4,7[e]	18,0±5,2[b]	21,8±4,0[i]	22,8±2,3
22:6ω3	7,5±2,0[f]	8,1±2,0	7,7±2,3[h]	6,8±2,2
Summe der Doppelbindungen	186	166	161	163
Prozent Doppelbindungen von 20:4 und 22:6	79	73	83	82

Tab. 16: Vergleich der Fettsäurenzusammensetzung mitochondrialer Membranen von Lebern männlicher und weiblicher Ratten unter Standarddiät mit und ohne chronische Alkoholgaben.

Die Bestimmung erfolgte wie unter 2.2.4.4. angegeben. Die Zahlen geben relative Anteile in % an.

Alkoholgruppe unterschiedlich zur entsprechenden Kontrollgruppe mit

a : $p < 0,05$
b : $p < 0,01$
c : $p < 0,001$

Männliche bzw. weibliche Kontrollgruppe mit Standarddiät (Tab. 16) unterschiedlich zur entsprechenden Kontrollguppe mit Palmindiät (Tab. 17) mit

d : $p < 0,05$
e : $p < 0,01$
f : $p < 0,001$

Weibliche Kontrollgruppe unterschiedlich zur entsprechenden männlichen Kontrollgruppe mit

g : $p < 0,001$; weitere Signifikanzen s. Tabelle 17.

	♂ Saccharose,N:4	♂ chronisch EtOH,N:5	♀ Saccharose,N:6	♀ chronisch EtOH,N:4
16:0	26,0±1,4	23,6±1,6	16,0±1,7	19,9±2,3[a]
16:1	4,9±0,2	5,6±1,3	1,7±0,4	4,0±0,8[c]
18:0	22,6±2,3	21,6±2,9	30,6±2,9	25,4±4,4
18:1 ω 9	14,7±2,4	11,9±2,5	10,5±1,3	10,9±1,3
18:1 ω 7	7,2±1,8	8,0±1,6	3,5±0,6	6,3±1,4[b]
18:2 ω 6	5,9±1,3	9,1±1,6[a]	6,8±1,1	7,4±1,4
20:4 ω 6	15,6±2,9	16,2±1,7	24,8±2,7	18,5±3,6[a]
22:6 ω 3	3,1±0,4	4,2±0,3	6,2±1,3	7,6±2,0
Summe der Doppelbindungen	120	134	166	156
Prozent Doppelbindungen von 20:4 und 22:6	68	67	82	77

Tab. 17: Vergleich der Fettsäurenzusammensetzung mitochondrialer Membranen von Lebern männlicher und weiblicher Ratten unter Palmindiät mit und ohne chronische Alkoholgaben.
Die Bestimmung erfolgte wie unter 2.2.4.4. angegeben. Die Zahlen geben relative Anteile in % an.

Weibliche Kontrollgruppe mit Standarddiät (Tab. 16) unterschiedlich zur männlichen Kontrollgruppe mit Palmindiät (Tab. 17) mit

h : $p < 0,01$
i : $p < 0,001$

Signifikanzen s. Tabelle 16.

nach Palmindiät mit und ohne Alkohol stark erniedrigt (~60%) im Vergleich zur Kontrolle mit Standarddiät). Stearinsäure 18:0 nimmt leicht (14%), Ölsäure 18:1ω9 stark zu (84%), wobei chronische Alkoholgaben zur Wiederabnahme führen, wie dies auch mit Standarddiät beobachtet wird. Auffallend ist noch die starke Abnahme der Docosahexaensäure 22:6ω3 mit Palmindiät (59%).

Insgesamt gesehen läßt sich also gegenüber der Kontrolle unter Standarddiät eine Verschiebung zugunsten kürzerer Kettenlänge und höherem Sättigungsgrad beobachten. Dabei gibt Alkohol in Kombination mit der Standarddiät die Richtung der Veränderung an. Für manche Fettsäuren, insbesondere Ölsäure und Arachidonsäure, ist unter Palmindiät ohne Alkohol eine andere Ausgangslage als unter Standarddiät mit Alkohol gegeben.

Werden die relativen Fettsäurenanteile der Lebermitochondrien männlicher und weiblicher Ratten in Tabelle 16 miteinander verglichen, so fällt unter Kontrollbedingungen ohne Alkohol bei weiblichen Tieren die starke Zunahme der Stearinsäure 18:0 (40%) und starke Abnahme der Linolsäure 18:2ω6 (44%) auf. Der Arachidonsäureanteil 20:4ω6 ist etwas verringert (15%) ebenso, wie die Vaccensäure 18:1ω7 (38%). Letztere ist aber wie bei männlichen Ratten unter allen Ernährungslagen gleich häufig vertreten. Die deutlich feststellbare Verschiebung des Fettsäurenmusters zur Stearinsäure bei Abnahme von Linol- und Arachidonsäure bedingt anscheinend nach Abbildung 16 eine Verringerung der Protonenleckpermeabilität, was durch verbesserte Packung der Membran bei diesem Fettsäurenmuster zu erklären wäre.

Aber auch Erhöhung der Protonenleckpermeabilität läßt sich bei Abnahme von Linol- und Arachidonsäure feststellen, wie Vergleich der männlichen Kontrollen ohne Alkohol in Tabelle 16 und 17 zeigt. Hier ist allerdings die Ölsäure stark erhöht (84%), bei weiblichen Kontrollen ohne Alkohol dagegen konstant im Vergleich zur männlichen Kontrolle (Tab. 16).

Bei der Ölsäure verursacht die einfache cis-Doppelbindung die stärkste Abbeugung der Fettsäurenkette aus ihrer zur Membranoberfläche senkrechten Anordnung vom C-Atom 9 an, was die Wechselwirkungsmöglichkeiten der Ketten und damit ihre Packungsdichte verringert. In Übereinstimmung damit wird erhöhte Protonenleckpermeabilität, d.h. passive Permeabilität, gefunden.

Mehrere Doppelbindungen verringern die Abbeugung aus der senkrechten Anordnung und damit tendenziell die Strukturauflockerung und Protonenleckpermeabilität, was bei Zunahme der hochungesättigten Fettsäuren auch eintritt (s. 74). Andererseits verringern kürzere Ketten die Packungsdichte wie nach Palmindiät, was hier erhöhte Protonenleckperme-

abilität mitbedingt.

Der Anteil der Doppelbindungen, die aus den hochungesättigten 20:4- und 22:6 -Fettsäuren stammen, korreliert gut mit den gemessenen mitochondrialen Energieparametern (Protonenpermeabilität, Kalium- und Calciumaufnahme), weniger mit dem ACR. Zu diesem stehen die als Summe der Doppelbindungen berechneten Zahlen der Tabelle 16 und 17 in einem positiven Verhältnis. Der üblicherweise benutzte Quotient 20:4/18:2 war zu keinem der gemessenen mitochondrialen Parameter korreliert und ist deshalb nicht aufgeführt.

Aus diesen Überlegungen folgt, daß im wesentlichen Öl-, Linol- und Arachidonsäure die permeativen Eigenschaften der Membran bestimmten. Nach chronischen Alkoholgaben bei weiblichen Tieren wird im wesentlichen nur Linolsäure erhöht (51%). Sie scheint unter diesen Bedingungen die beobachtete gesteigerte Protonenleckpermeabilität zu verursachen (Abb. 16). Wird weiblichen Ratten Palmindiät gegeben (Tab.17) so zeigt es sich, daß ohne Alkohol nur geringfügige Verschiebungen des Fettsäurenmusters im Vergleich zur Kontrolle männlicher Ratten mit Standdarddiät auftreten: Arachidonsäure ist leicht (14%), Ölsäure stärker erhöht (27%), was wiederum in Einklang mit der Änderung der Protonenleckpermeabilität in Abbildung 16 steht.

Änderungen der Fettsäurenzusammensetzung nach Palmindiät fallen bei weiblichen Ratten kaum ins Gewicht, bei männlichen Ratten dagegen sind sie gravierend (s.o.). Insbesondere fällt auf, daß die Docosahexaensäure kaum verändert ist, während sie bei männlichen Ratten nach Palmindiät auf etwa die Hälfte abnimmt. Zusätzliche Gabe von Alkohol bei weiblichen Ratten unter Palmindiät erhöht die kurzkettigen Fettsäuren 16:0 und 16:1. Stearin- und Arachidonsäure nehmen ab (17% bzw. 25%); Öl- und Linolsäure sind unverändert, so daß insgesamt nur geringfügige Zunahme der Protonenleckpermeabilität folgt.

Die Protonenleckpermeabilität läßt sich also bei Mitochondrien männlicher und weiblicher Tiere aus den veränderten Fettsäurenmustern befriedigend erklären. Die schon angesprochene Diskrepanz zwischen dem ACR und der Protonenpermeabilität bzw. anderen energieabhängigen Prozessen bei Kalium und teilweise bei Calcium bleibt aber bestehen und ist über Unterschiede im Fettsäurenmuster nicht zu erklären:
Während bei männlichen Tieren allein innerhalb verschiedener Versuchsanordnungen alle diese Parameter im Einklang sind, bleibt für beide nur die Korrelation von ACR und LPO bestehen, wobei bei weiblichen Ratten beide erniedrigt sind, während andere Energieparameter eher erhöht sind. Dennoch scheint der ACR, wie er hier bestimmt wurde, bei männlichen Ratten in sich

stimmig die Energieparameter zu erfassen.

Die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren werden erklärbar, wenn der auf Seite 89 erwogene Kurzschluß der Atmung beträchtlich sein könnte und bei beiden Geschlechtern unterschiedliches Gewicht hätte, was Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müßte.

Die hier erhaltenen Versuchsergebnisse hinsichtlich der Fettsäurenzusammensetzung mitochondrialer Membranen sind in etwa mit denen von Thompson und Reitz (75) vergleichbar. Hinderlich ist in diesem Fall, daß dort keine Angabe über die jahreszeitliche Durchführung enthalten ist. Auch bei den hier dargestellten Ergebnissen muß ein Zeitfaktor von etwa drei Wochen für die Versuchsdurchführung selbst in Rechnung gestellt werden.

4. DISKUSSION

4.1. THEORETISCHER TEIL: SPEZIELLE ERGEBNISORIENTIERTE DISKUSSION

4.1.1. Allgemeines Modell der Induktion, Promotion und Inhibition der LPO

Die LPO ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, die die Radikalbildung, deren Promotion und Löschung betreffen. Hinzu kommen bei Mitochondrien noch weitere Beeinflussungen, da die Membrankomponenten aufgrund der Atmung sehr unterschiedliches und variables Redoxverhalten zeigen.

Abbildung 24 zeigt Arachidonsäure als typische Komponente des Lipidanteils (von etwa 24% des Trockengewichts der Innenmembran). Diese enthält drei Methylengruppen in leicht aktivierbarer Allylstellung. Ein peroxidativer Angriff erscheint dadurch möglich:
1. nach Reaktion I mit Hilfe von komplexierten Metallionen und/oder
2. nach Reaktion II durch das Superoxidanion-Radikal ($O_2^{-\bullet}$) als Primärradikal.

Zu 1: Angenommen werden muß für die notwendige Reaktivität des Sauerstoffs eine Komplexbildung mit einem Kation, das in der Lage ist, einen reaktiven Übergangszustand herzustellen (76). Hier dienten Fe^{2+}-Ionen diesem Zweck (auch Ionen anderer Schwermetalle wie z.B. die von Kupfer (77) sind möglich). Da das Redoxpotential für das $O_2/O_2^{-\bullet}$ Paar noch stark negativ (E_o' =- 0,33V,(78) und die freie Energie der Bildung um Null oder leicht positiv ist (79), ist die Bildungstendenz nicht sehr hoch.
Komplexbildung des Fe^{2+} ist notwendig. Üblicherweise wird ADP zur Verstärkung der LPO benutzt (s. Abb. 13), was im wesentlichen auf einer verbesserten Membranlöslichkeit des (Fe^{2+}/O_2)-ADP-Komplexes beruht. Seine Bildung spielt sicher auch bei der endogen vorhandenen LPO eine Rolle. Jedenfalls gibt es keinen Grund gegen die Annahme, daß auch diese über ubiquitär vorhandene komplex gebundene Übergangsmetallionen wie Fe^{2+}/Fe^{3+} katalysiert wird, so daß das zugesetzte Fe^{2+}/ADP nur die Katalysatormenge nicht den katalysierten Prozeß verändert. ADP als geeigneter Komplexbildner ist in Mitochondrien und Zytosol in weit größerer Konzentration als den bei der in vitro LPO angewandten 60µM vorhanden.

Um die Fettsäuren erreichen zu können, ist eine gewisse Löslichkeit in der lipophilen Membran erforderlich, die für Ionen a priori fast nicht vorhanden ist, durch das Verschwinden der positiven Ladungen des Fe^{2+}-Ions durch Komplexbildung mit dem bei pH 7,2 negativ geladenen ADP aber er-

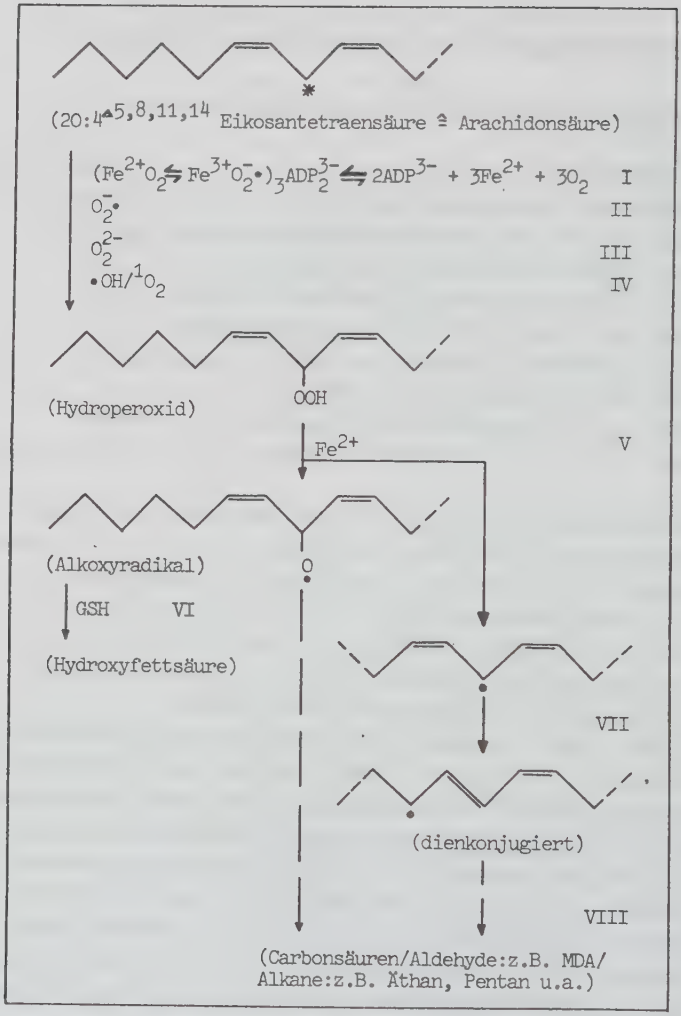


Abb. 24: Hypothetisches Schema der LPO in Mitochondrien. Erklärung der Reaktionswege erfolgt im Text. Die Reaktionspfeile geben nicht einen zwingenden konsekutiven Reaktionsablauf wider, sondern dienen vornehmlich der Orientierung.

möglicht wird.

An der Membranoberfläche ist wegen des negativen Oberflächenpotentials die Dissoziation von Säuren zurückgedrängt und die Bildung von ADP^{2-} aus ADP^{3-} wahrscheinlich. Es folgt daraus, daß

1. Änderungen der Oberflächenladungen durch Energetisierung oder Deenergetisierung mittels Atmung einen Einfluß auf die LPO haben müssen, da der $ADP/Fe/O_2$-Komplex verschieden leicht in die Membran tauchen kann,
2. daß die Stöchiometrie der Komplexbildungsreaktion nach I und die Aktivitäten der Reaktanden die LPO verschieden stark induzieren können.

Beide Faktoren sind nicht streng voneinander zu trennen, denn ein Wechsel des Atmungszustandes wie er durch Zugabe von ADP erreicht wird (Deenergetisierung bei Übergang zur Status 3-Atmung) erhöht einerseits die Membranlöslichkeit des Fe^{2+}, senkt andererseits aber die zur Verfügung stehende ADP-Menge (ADP wird dem exogenen Medium entnommen, und gegen ATP ausgetauscht), (s. Diskussion).

Wenn sich trotzdem, entgegen den oben gemachten Annahmen, unter hoher Energetisierung eine hohe und bei niedriger Energetisierung eine niedrige LPO einstellt (s. 3.1.2. im Vergleich mit 3.2.1.5.) dann folgte daraus, daß die Membranlöslichkeit einen nur geringen Einfluß auf die LPO hätte, und daß die Reaktion I nicht so sehr der Initiierung der LPO diente.

Zu 2: Es ist bekannt, daß Flavoproteine (in den Komplexen I (NADH-Ubichinon-Reduktase) und II (Succinat-Ubichinon-Reduktase) und der Komplex III (Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase) häufig Ein-Elektronen-Schritte katalysieren (s.u.). Auch eine Beteiligung von Fe/S-Komplexen ist eventuell zu berücksichtigen (80). Bei den Radikalen im Flavoproteinbereich wäre eine Redoxpotential zu erreichen, daß negativ genug ist für eine einstufige Reduktion von O_2. Unterstützend wirkte hier die hohe O_2-Konzentration in der Membran. Man erhält dann das $O_2^{-}\cdot$ Radikal, das möglicherweise zwar als solches selbst nicht in der Lage ist, Fettsäuren zu peroxidieren (81), das aber Vorstufe aller anderen reaktiven Sauerstoffspezies sein kann (II,III,IV, s.u.).

Wichtig erscheint es, darauf hinzuweisen, daß die Bildung von $O_2^{-}\cdot$ direkt vom Redoxzustand der Flavoproteine abhängt. Dieser aber ist streng an die Atmung gekoppelt (s. 4.1.2.).

Eine zweifache Reduktion des O_2 führt zum Peroxid (III). Wasserstoffperoxid wurde im Zusammenhang mit der mitochondrialen Atmung schon mehrfach beobachtet (82,83), und es ließ sich auch eine Abhängigkeit der Bildungsrate von dem Atmungszustand nachweisen (s.4.1.2.).

Als besonders reaktiv werden das Hydroxylradikalund der Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g$ am wahrscheinlichsten; möglicherweise auch $^1\Sigma^+_g$ (84)) angesehen. Postulierte Mechanismen der Bildung sind:

1. der Haber-Weiß-Zyklus (s. 85, s. 86)
   $O_2^{-\bullet} + O_2^{2-} + 2H^+ \longrightarrow \bullet OH + OH^- + {}^1O_2$
2. eine der Fenton-Reaktion ähnliche Reaktionsfolge (s. 86)
   $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{3+}$

Nachteil fast aller Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der Radikalbildung ist, daß diese in wässrigen Phasen beobachtet wurden. Die LPO aber läuft in einem aprotischen Membranmilieu ab. Zutritt von Wasser, d.h. von Protonen steht der Stabilisierung des Primärradikals entgegen (s. 4.1.2.).

Die Bildung eines Hydroperoxids scheint eine relativ stabile Übergangsverbindung in der molekularen Abfolge der LPO zu sein: Hydroperoxide dienen zum Nachweis der LPO (Bestimmung des sogenannten Peroxid-Wertes), z.B. jodometrisch (87). Ihr Zerfall wird durch Fe^{2+}-Ionen wesentlich beschleunigt (54, 88). Denkbar ist dabei als Übergangsprodukt ein Alkoxyradikal, das seinerseits entweder eine neue Radikalbildung initiiert oder das bei ausreichendem antioxidativen Schutz zur Hydroxyfettsäure reduziert wird (89). Der antioxidative Schutz besteht neben Substanzen vom Typ des Vitamin E (90) vor allen Dingen aus Glutathion (GSH). Die Menge des zur Verfügung stehenden GSH aber ist stark abhängig vom Redoxzustand des Mitochondriums (s. Allgemeine Diskussion) und von der Aktivität der GSH-Peroxidase. Die Reaktion VI führt auf jeden Fall zu einer Fettsäure, die den Membranaufbau aufgrund ihrer sperrigen und polaren Seitenstruktur behindert. Eine Änderung verschiedener Membranparameter könnte die Folge sein.

Der Zerfall des Hydroperoxids führt sicher auch zu einem aliphatischen Radikal, das über Isomerisierung (VII) eine dienkonjugierte Fettsäure ergibt. Messung der Dienkonjugation dient dem Nachweis der LPO. Sie wurde auch schon zum Nachweis von LPO nach akuten und chronischen Alkoholgaben herangezogen, wobei die Ergebnisse unterschiedliche Interpretationen erlaubten (91,92,93).

Die Reaktion VIII umfaßt eine Vielzahl von Reaktionen, die die Initiierung, Promotion und die Radikallöschung beinhalten (s.94). Inwieweit diese Mechanismen vom Atmungsstatus der Mitochondrien abhängen, ist nicht festzustellen. Die Beeinflussung wird als gering gegenüber der Radikalbildung und Löschung von $O_2^{-\bullet}$ (I) angenommen.

Zerfallsprodukte der Lipide der Membran sind schließlich Carbonsäuren, Aldehyde (z.B. MDA), Alkohole und Alkane (z.B. Äthan).

4.1.2. Die Abhängigkeit der LPO vom energetischen Zustand der Mitochondrienmembran

4.1.2.1. Die Bildung des Superoxid-Radikals

Notwendig für LPO sind reaktive Sauerstoffspezies. Als Vorstufe ist allen das $O_2^{-\bullet}$ gemeinsam (s.4.1.1.). Bestimmte Atmungskettenkomponenten scheinen in der Lage zu sein, molekularen Sauerstoff, der sich in der Membran löst, zu reduzieren (Abb. 25, Reaktionswege I, II, III). Nachgewiesen wurde dies für die isolierten Komplexe I und III der Atmungskette (82), für submitochondriale Partikel (95) und für Fe/S-Komplexe (80). Die Entwicklung von H_2O_2 in Mitochondrien (96,83,97) wird dabei ursächlich mit der Bildung von $O_2^{-\bullet}$ als Vorstufe in Verbindung gebracht (95). Dies wurde indirekt geschlossen aus Messungen der Chemilumineszenz bei submitochondrialen Partikeln (95). Ursache für die Chemilumineszenz ohne Luminol (very weak luminescence (98)) ist wahrscheinlich der Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$), der nach Dismutation von 2 Molekülen $O_2^{-\bullet}$ entsteht (84); mit Luminol ist der Reaktionspartner H_2O_2 (99).

Da aufgrund der Statusabhängigkeit der LPO auf einen Zusammenhang von $O_2^{-\bullet}$ Bildung und Redoxzustand geschlossen werden muß, sollten sich extrem unterschiedliche Redoxgrade von Anfangsgliedern der Atmungskette auch im Chemilumineszenz-Verhalten bemerkbar machen. Dies zeigt Abbildung 11. Man erkennt, daß Reduktion der Atmungskette nach Antimycin A vor dem Gross-Over-Point zu einer verstärkten Chemilumineszenz führt. Die Wirkung des KCN scheint in einer direkten Reaktion mit Luminol begründet zu sein (s.3.2.1.7.). Bei höherem pH (Abb. 12) tritt sie nicht mehr so deutlich zum Vorschein, allerdings bildet sich ein Peak aus, der nicht erklärt werden kann.

Eine Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweises der Chemilumineszenz durch stärkere Alkalisierung zeigt deutlich, daß sich im Status 4 mit Succ durch Manipulation mit Atmungskettenhemmern und Entkopplern eine unterschiedliche Chemilumineszenz erreichen läßt (Abb. 12). Dies spricht in einem ersten Ansatz für unterschiedliche Bildungsraten von $O_2^{-\bullet}$. Dementsprechend unterschiedlich ist auch die LPO: Sie ist abhängig von der Atmung selbst (stärker bei höherem Reduktionsgrad der substratseitigen Atmungskettenkomponenten im Status 4 als im Status 3), (Tab. 6), und sie ist abhängig von Hemmern der Atmungskette.

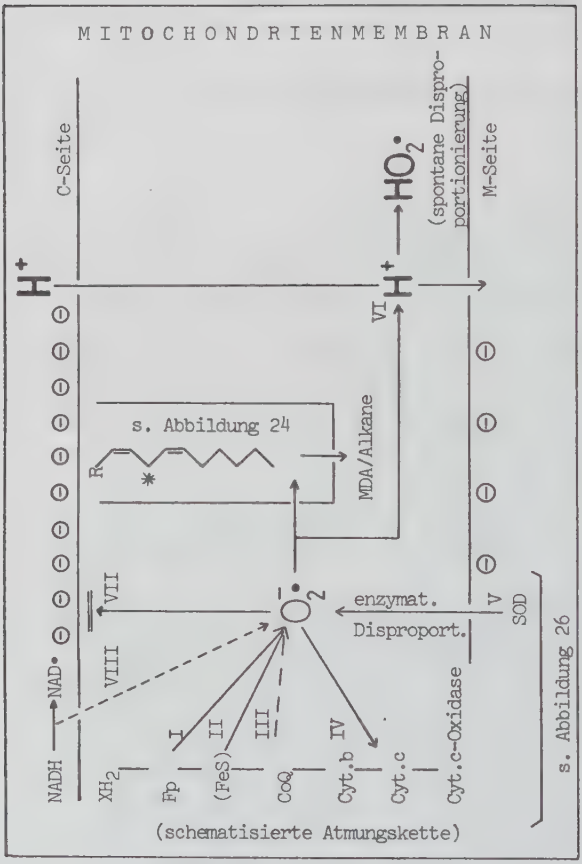


Abb. 25: Erklärungsmodell für die Abhängigkeit der LPO vom energetischen Status der Mitochondrien
Erklärungen siehe Text.

Es fällt auf, daß zwar die Chemilumineszenz nach Antimycin A erhöht ist (hohe Bildungsrate $O_2^{-\bullet}$), daß aber die LPO im wesentlichen unverändert ist im Vergleich zur Messung ohne Hemmsubstanz. Rotenon dagegen, das nur die NADH-abhängige nicht die Succinatoxidation hemmt, führt zu einem deutlichen Anstieg der LPO (bei der Messung der Chemilumineszenz wirkt es kaum) und KCN am terminalen Ende der Atmungskette erniedrigt die LPO deutlich (Tab. 6). Folgende Erklärung wird vorgeschlagen: Angenommen wird, daß dem Cytochrom b_{566} (oft mit b_T bezeichnet) eine entscheidende Funktion in der Steuerung der Atmungsaktivität zukommt (s. 100). Je nach Reduktionsgrad der Anfangsglieder der Atmungskette steuert es den Elektronenfluß auf das Cyt c_1, da es sowohl in einem für hohen Elektronenfluß geeigneten Zustand mit einem Redoxpotential von E_o' =-30mV, als auch in einem den Elektronenfluß einschränkenden Zustand mit einem E_o' =245mV ("high energy form": $b_T \sim I$) vorliegen kann. Das bedeutet,daß starke Reduktion aufgrund hohen Elektronendrucks bei hoher Membranenergetisierung zu starker LPO führt; bei ßHOB als Substrat mehr als bei Succinat. Succinat zeigt höhere Atmungsraten als ßHOB (Tab. 14). Erfolgt Hemmung mit Rotenon so erhöht sich die LPO, da sich der Elektronendruck vor der Hemmstelle substratseitig erhöht, ohne daß sich Cytochrom b_T verändert. Succinat und Rotenon steigern auch die LPO: Cytochrom b_T ist unverändert und es ergibt sich ein hoher Reduktionsgrad von der Substratseite der Hemmstelle. Es könnten hier im einen Fall Flavoproteine und NADH (s. Bemerkung auf Seite 39), im anderen Fall Flavoproteine, Coenzym Q und das Cyt. b_T selbst Radikalbildner sein. Antimycin A dagegen senkt die LPO mit Succinat und ßHOB (Tab. 6). Eine Erklärung dafür kann nicht angeboten werden. Auch die Chemilumineszenz-Messung zeigt erhöhte H_2O_2-Produktion. Möglicherweise muß mit einer verstärkten Inaktivierung des $O_2^{-\bullet}$ gerechnet werden oder Antimycin A selbst verhindert die Radikalbildung (101).

Zugabe von KCN schließlich führt zwar zu einer starken Reduktion aller Atmungskettenglieder, aber das CN^-Ion hat auch deenergetisierende entkoppelnde Eigenschaften. Darüberhinaus ist es denkbar, daß KCN die Reduktion des O_2 am Cytochrom b_T selbst verhindert, wie von Flohé et al. vorgeschlagen (95). Messungen der weichen Chemilumineszenz ergaben für den Status 4 und nach Gabe von Antimycin A höhere Werte als im Status 3 oder nach Entkopplung (102).

Die Reduktion von O_2 durch NADH (exogen im Überschuß gegeben) soll hier der Vollständigkeit halber aufgeführt werden (VIII der Abb. 25), wenn sie auch im einzelnen unklar ist. Die Relevanz für Zustände hoher NADH-Mengenwie z.B. nach Alkoholgaben ist evident.

4.1.2.2. Die Inaktivierung des Superoxid-Radikals

Entscheidend für die Wirksamkeit des $O_2^{-}\bullet$ ist nicht nur seine Entstehungsrate, sondern auch seine Stabilität und damit seine Lebensdauer. Da es selbst wahrscheinlich keine Initialradikalbildung verursachen kann, muß es nach den in 4.1.1. beschriebenen oder ähnlichen Mechanismen reagieren, um seine Reaktivität zu erhöhen. In Konkurrenz dazu treten Reaktionen, die zu einer Inaktivierung führen:

1. Die Superoxid-Dismutase (SOD) baut $O_2^{-}\bullet$ enzymatisch ab (103), (Reaktion V der Abbildung 25):

$$O_2^{-}\bullet + O_2^{-}\bullet + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Mitochondrien besitzen zwei verschiedene SOD; die eine befindet sich im Intermembranraum (Cu- und Zn-haltige SOD), die andere ist in der Matrix lokalisiert (Mn-haltig), (104,105). Entscheidend ist der Zugang der SOD zum Ort der $O_2^{-}\bullet$ Radikalbildung. Als Entstehungsort und als Ort höchster Wirksamkeit muß die lipophile Membran angenommen werden. Reaktion von $O_2^{-}\bullet$ mit H_2O in der Membran-Wasser-Interphase führt zu einer stark erhöhten Disproportionierung (s.u.). Der dabei entstehende potentiell stark reaktive Singulett-Sauerstoff hat aber in Wasser nur eine außerordentlich kurze Lebensdauer von 2µs (s. 106). Anders in der Membran. Das $O_2^{-}\bullet$ Radikal hat eine wesentlich verlängerte Lebensdauer (s. 107), was die Wahrscheinlichkeit der Interferenz mit schon aktivierten Fettsäuremolekülen erhöht.

Kommt es zur Protonierung (s.u.) bildet sich außerordentlich schnell durch nicht-enzymatische Disproportionierung Singulett-Sauerstoff($^1O_2$). Die enzymatische Disproportionierung mit SOD führt dagegen zum Triplett-Sauerstoff ($^3O_2$).

Der Zugang der SOD von beiden Seiten der Innenmembran ist allerdings sicher abhängig vom Oberflächenpotential der Membranoberseiten. Niedriges Potential (≙ geringer Ladungsdichte aufgrund geringer Energetisierung) würde den Zugang von außen erleichtern. Folglich wäre eine Abnahme der LPO anzunehmen. Dies ist in Einklang mit den Befunden.

2. So wie sich die Lebensdauer des $O_2^{-}\bullet$ mit der Penetrationsfähigkeit der SOD verringert, so verkürzt sie sich auch durch Verlassen des hydrophoben Membranmilieus (s.o.), (Reaktion VII der Abb. 25). Bei geringer Energetisierung der Membran ist der Durchgang durch die äußere Membran-Wasser-Interphase mit ihrer verringerten negativen Ladungsdichte erleichtert. Es zeigt sich, daß die LPO abnimmt (Status 4 ⟶ Status 3 Übergang, Tab. 6). Für Erythrozyten wird der Transport von $O_2^{-}\bullet$ im Anionen-Kanal

der Membran diskutiert (108). Darüberhinaus ergibt sich bei Manipulation der Oberflächenladungsdichte durch zusätzliches Aufbringen von Anionen (Vermehrung der negativen Ladungen) oder Kationen (Verminderung der negativen Ladungen) eine Beeinflussung der LPO in die postulierte eine oder andere Richtung, wie dies Tabelle 7, Tabelle 8 und Abbildung 10 zeigen. Der Membran kommt hiermit eine Käfigfunktion für $O_2^{-}\bullet$ zu. Bestätigt wird dies durch Befunde von Gennaro und Romeo (104), die feststellten, daß die $O_2^{-}\bullet$ Freisetzung aus Granulozyten durch Aniontransportinhibitoren (die alle amphiphile Anionen waren) gehemmt wurde. Es bleibt allerdings unklar, welchen Beitrag die Innenseite der Mitochondrienmembran liefert. Alle getesteten Substanzen sind nicht membrangängig. Bekannt ist aber die Asymmetrie der mitochondrialen Membran (109), die zu unterschiedlichen Oberflächenladungen und ihrer gegensinnigen Abhängigkeit vom Energetisierungszustand auf beiden Seiten der Membran führt.

Auch das Äthanolmolekül scheint die LPO positiv zu beeinflussen (s.Abb.4, A und C). Der Effekt ist aber wahrscheinlich unspezifisch und beruht auf der allen Alkoholen zugeschriebenen Stabilisierung biologischer Membranen im niederen Konzentrationsbereich (49). Bangham und Mason zeigten, daß Äthanol in konzentrationsabhängiger Weise das Oberflächenpotential einer Glyceryl-monooleat- oder Phosphatidylcholin-Monolayer erhöht (negativiert), (110). Höhere Konzentrationen führen zur Desintegration der Membran. Eine Stabilisierung konnte für Äthanol auch durch Messung des Ordnungsparameters ΔS nachgewiesen werden (111).

4.1.2.3. Einfluß der Protonenpermeabilität und die Wirkung von Entkopplern

Die Disproportionierung von $O_2^{-}\bullet$ ist stark abhängig von der Möglichkeit der Protonierung (112). Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

$$O_2^{-}\bullet + O_2^{-}\bullet \longrightarrow O_2^{2-} + O_2$$

beträgt ungefähr $100 M^{-1} sec^{-1}$, nach Protonierung eines Partners aber $8{,}5 \cdot 10^7 M^{-1} sec^{-1}$. Der pk_a-Wert der schwachen Säure $HO_2\bullet$ liegt bei 4,88. Diese Werte wurden in wäßrigen Medien bestimmt, die tatsächlichen Verhältnisse für die Membran sind unbekannt. Immerhin liefern sie einen Hinweis dafür, daß die $O_2^{-}\bullet$ Radikale bei Vorhandensein von Protonen schnell disproportionieren können, wobei das reaktive $^1O_2$-Molekül entsteht (VI in Abb. 25), (s. 113).

Zwei Zustände sind denkbar, in denen Protonen membrangängig werden:

1. Membranen sind keine absoluten Permeabilitätsbarrieren. Aufgrund des hohen pH-Gradienten bei Mitochondrien leckt ein Teil der Protonen in den Matrixraum zurück. Ausdruck dieser Protonenpermeabilität kann der ACR sein. Erniedrigung zu kleineren Werten, was einer erhöhten Protonenpermeabilität entspräche, müßte zu erhöhter $^1O_2$-Bildung und folglich auch erhöhter LPO führen. Dies ist nicht der Fall, wie Abbildung 5 und 9 zeigen. Erhöhung der Protonenpermeabilität (diese ist dargestellt in Abbildung 16 und beruht dort auf Veränderungen der Fettsäurenzusammensetzung der Membran) verringert die LPO. Daraus kann geschlossen werden, daß nicht die Disproportionierung die entscheidende Rolle spielt, sondern die Deenergetisierung, d.h. die Verringerung der Oberflächenladungen: Inaktivierung von $O_2^{-\bullet}$ erfolgt durch Disproportionierung außerhalb der Membran oder durch erleichterten Zugriff der SOD.

Denkbar ist darüberhinaus auch, daß aufgrund der unterschiedlichen Packungsdichte der Membran im energetisierten oder deenergetisierten Zustand der peroxidative Angriff auf entsprechende Fettsäuren erschwert wird. Starke Umorientierung der inneren mitochondrialen Membran nach Entkopplern wurden durch Kleinwinkel-Röntgenstreuung (114) und "Spin-Labeling"(115) beobachtet. Zudem konnte festgestellt werden, daß der Entkoppler DNP die Phospholipase-Aktivität der Mitochondrien erhöht, so daß eine gelockerte Membranstruktur die Folge ist (116).

2. Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung besitzen die Eigenschaft, als Carrier für Protonen zu wirken. Sie verkleinern konzentrationsabhängig die Membranenergetisierung, was sich im erniedrigten ACR bemerkbar macht (s. Abb. I, Anhang).

Titration von mitochondrialen Suspensionen mit Entkopplern hat eine Abnahme der LPO zur Folge (s. Abb. 6,7 und 8). Die Membrangängigkeit des Entkopplers ist allerdings notwendige Voraussetzung der Wirkung, wie Abbildung 8 F zeigt (Pikrinsäure ist nicht membrangängig (62)).

Die Fähigkeit der Entkoppler, die LPO zu vermindern, ist allerdings unterschiedlich ausgeprägt und unter den getesteten können 4HBM, CCCP und DNP in engen Konzentrationbereichen die LPO sogar wieder verstärken (Abb. 6-8). Ein Einfluß der Reaktion VII (Abb. 25) kann ausgeschlossen werden, denn die Oberflächenladungsdichte verringert sich bei steigender Entkopplerkonzentration noch weiter, die LPO steigt aber an: Das be-

deutet, daß manche Entkoppler selbst als Initiator oder Promotor der LPO wirksam werden können.

Folgende Darstellung soll den Wirkmechanismus erläutern; dabei wird von einem Flavoprotein ausgegangen (andere Komponenten der Atmungskette sind auch geeignet (s. 4.1.1.)):

$$FPH_3 \xrightarrow{-e^{\ominus}} FPH_2\bullet \xrightarrow{-e^{\ominus}} FPH \qquad (1)$$

$$FPH_2\bullet + O_2 \longrightarrow FPH + O_2^{\ominus}\bullet + H^{\oplus} \qquad (2)$$

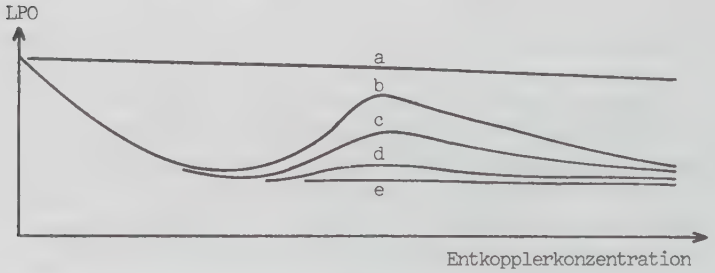
$$FPH_2\bullet + {}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R \longrightarrow FPH_3 + \bullet\underline{O}\text{–}R \qquad (3)$$

Nach Reaktion (1) kann ein Flavoprotein durch einen Ein-Elektronen-Schritt ein Radikal bilden. Dieses "Semichinon-Radikal" ist nach (2) in der Lage, O_2 zu reduzieren (s.4.1.1.). Zunehmende Deenergetisierung, d.h. Oxidation der Flavoproteine aufgrund steigender Entkopplerkonzentrationen, führt zur Abnahme der LPO, ohne daß es zum Wiederanstieg kommt (e der schematischen Darstellung (s.u.)). Dies gilt für 2,4-Dinitrokresol (Kres) und 4-Hydroxybenzyliden-malondinitril (4HBM)).

In Konkurrenz zu (2) tritt Reaktion (3), wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind (${}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R$ bezeichnet das Entkoppleranion):
Bei höheren Entkopplerkonzentrationen und dem daraus resultierenden höheren Oxidationsgrad des Flavoproteins wird E_h des Redoxpaares $\frac{FpH_2\bullet}{FpH_3}$ so stark positiv, daß eine Reduktion von $FpH_2\bullet$ durch ${}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R$ (dessen E_h bestimmt sich aus dem Redoxpaar $\frac{R\text{-}\underline{O}\bullet}{R\text{-}\underline{O}|^{\ominus}}$) möglich wird (3). Zudem wird es einen Bereich für die Oxidation der reduzierten Flavoproteine geben, wo der Zwei-Elektronen-Schritt aufgrund des stark erniedrigten Redoxpotentials bevorzugt ist. Das Entkoppleranion muß auf jeden Fall oxidierbar sein, was z.B. für 4HBM nicht gilt (Abb. II, Anhang).

Darüber hinaus hängt das Ausmaß der Reaktion (3) von der tatsächlich zur Verfügung stehenden ${}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R$-Konzentration in der Membran ab. Diese bestimmt sich sicher auch nach der exogen vorhandenen ${}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R$-Menge, die wiederum vom pk_a-Wert abhängig ist. Sie variiert zudem mit der H^+-Konzentration außerhalb des Mitochondriums, die je nach Atmung unterschiedlich groß sein kann. Da die Entkoppler schwache Säuren sind, liegt der asymptotische Bereich ihrer Titrationskurve im physiologischen pH-Bereich. Das bedeutet, geringe pH-Unterschiede verändern die aktuelle ${}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R$-Konzentration stark. Eine Erhöhung der ${}^{\ominus}|\underline{O}\text{–}R$-Menge erfolgt nun in Abhängigkeit vom pk_a umso stärker, je kleiner der mitochondriale pH-Gradient wird (zunehmende äußere Alkalisierung durch Shuttle-Wirkung der Entkoppler). Daran ist eine Abnahme

der Oberflächenladungen gekoppelt, die die Membranpassage des $^{\ominus}\underline{\bar{O}}$–R verbessert und damit seine aktuelle Konzentration in der Membran erhöht. Dies scheint für FCCP (d), CCCP (c) und DNP (b) in zunehmendem Maße zu gelten (pk_{a1} für DNP:4,1; pk_a für CCCP:6,0 (117)).
Pikrinsäure zeigt wegen nicht vorhandener Membrangängigkeit keine Wirkung (a).



Schematisierte Abbildung der Abhängigkeit der LPO von der Entkopplerkonzentration aus den Kurven der Seiten 30 bis 32

Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß auch der Status der Atmung starke Veränderungen der LPO mit Entkoppler zeigen muß (s. Abb. 6, 7 und 8). Die Wirkung von 2,4-Dinitrokresol kann nicht erklärt werden, da es sich, der obigen Argumentation folgend, ähnlich wie DNP verhalten müßte.

Als Möglichkeit der Inaktivierung bleibt noch die Reaktion von $O_2^{-}\cdot$ mit oxidiertem Cytochrom c (IV in Abb. 25). In vitro dient diese Reaktion dem Nachweis von Superoxid-Radikalen (118, s.119). Seki et al. (120) bestimmten die Geschwindigkeitskonstanten mit $2\text{-}6 \cdot 10^5 M^{-1}s^{-1}$, wobei die Variation in der pH-Abhängigkeit begründet liegt. Nach Tabelle 9 verringert Cytochrom c die LPO, wobei die Wirkung besonders im Status 3 sehr ausgeprägt ist, was auch mit der dann erhöhten Oxidation des Cytochrom c erklärt werden kann.

Verlust von Cytochrom c (Tab. 10) erniedrigt die LPO sehr stark, was möglicherweise daran liegt, daß die Käfigfunktion der Membran irreversibel gestört ist. Erneute Cytochrom c-Zugabe verursacht keine zusätzliche LPO-Erhöhung und dies, obwohl die Atmungsaktivität wieder fast vollständig rekonstituiert werden kann.

Einen Hinweis für die Oxidation von $O_2^{-}\cdot$ durch Cytochrom c liefern auch Trumpower und Simmons (121). Sie stellten fest, daß die verstärkte Reduktion von Cytochrom c durch $O_2^{-}\cdot$ nach Zugabe von SOD aufgehoben wird. Bildung von $O_2^{-}\cdot$ erfolgte durch Thenoyltrifluoraceton vermutlich am Coenzym Q.

4.1.3. Abbauwege des Alkohols

4.1.3.1. Der NADH-Cytochrom c-Reduktaseweg

Schon lange ist das Enzym NADH-Cytochrom c-Reduktase der äußeren Mitochondrienmembran bekannt (s. 122), ohne daß ihm eine bestimmte Funktion zugeordnet werden konnte.

Es wird postuliert, daß die Reduktase Reduktionsäquivalente von NADH auf Cytochrom c der Atmungskette überträgt und daß ihr damit eine "Shuttle"-Funktion zukommt, wie es schon von Kiessling und Pilström vorgeschlagen wurde (123). Unabdingbare Voraussetzung dafür ist eine hohe Eigenbeweglichkeit von Cytochrom c, das als einzige Atmungskettenkomponente die Innenmembran reversibel nach hypotoner Schwellung verlassen kann (IV der Abb. 26). Der Abbau von Reduktionsäquivalenten des Alkohols über die NADH-Cytochrom c-Reduktase bietet mehrere Lösungsvorschläge für Probleme des Alkoholabbaus:

1. Das MEOS ist nicht vonnöten, denn die überkompensatorische Erhöhung der Abbaurate von Alkohol trotz Aktivitätsverlust der ADH (s. Einleitung) kann der verstärkten Einspeisung von Reduktionsäquivalenten beim Cytochrom c (Komplex IV) mit verringerter Energieausbeute (daraus

folgt Abnahme des P:O; Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs dO_2/dt, was auch bei Leberschnitten und perfundierter Leber beobachtet wurde) zugeschrieben werden. Es resultiert somit nur noch etwa 1/3 der gewinnbaren Energie gegenüber Einschleußung der Reduktionsäquivalente beim Komplex I.

Dies wäre auch eine elegante Erklärung für den von Israel et al. beobachteten hypermetabolischen Zustand der Leberzelle nach chronischen Alkoholgaben mit erhöhter endogener Atmung (124), (s. Tab. 13), zumal die postulierte erhöhte Aktivität der Na^+/K^+-ATPase von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte (125). Die Wirkung von Ouabain kann mit der nach Ouabain-Gabe resultierenden erhöhten Na^+-Konzentration im Zytoplasma erklärt werden: Die Mobilität des positiv geladenen Cytochrom c wäre durch verstärkte Bindung an die Mitochondrienmembran verringert (Verdrängung des kleineren K^+-Ions durch das aquatisiert größere Na^+-Ion führte wegen der größeren Debyelänge zu einer Erhöhung des Oberflächenpotentials).

2. Die schon von Pirola und Lieber (126) festgestellten "empty calories" nach Alkohol werden durch die geringe Effizienz der Einspeisung von Reduktionsäquivalenten beim Cytochrom c sehr leicht erklärt. Einen starken Energieverschleiß nach chronischen Alkoholgaben zeigt auch Abbildung 22 für männliche Ratten. Ein möglicher Einfluß des MEOS ist damit natürlich nicht erwiesenermaßen ausgeschlossen, aber Bleyman und Thurman (127) zeigten, daß eine Zunahme des Alkoholmetabolismus bei der Ratte noch bei Alkoholkonzentrationen von etwa 1mM zu erkennen war. Diese Konzentrationen liegen weit unter dem scheinbaren K_M-Wert des MEOS mit 8,5mM (128).

3. Die Mobilität des Cytochrom c wird gesteuert über das Oberflächenpotential der Mitochondrieninnenmembran. Dieses Potential hängt wiederum von zytosolischen Ionen (X^+, X^{++}) und der Lipidzusammensetzung der Membran (die die Packungsdichte beeinflußt) ab. Auch die Bindung von P_i an Cytochrom c ist wichtig (129), weil sie die für die Bindungsfestigkeit entscheidende positive Nettoladung des Cytochrom c erniedrigt. Veränderungen der Membran (s. Diskussion und 3.4.) nach chronischen Alkoholgaben haben also direkten Einfluß auf die Mobilität des Cytochrom c. Ein entsprechender Mechanismus wurde auch von Mokhava et al. für die Kälteadaptation der Ratte gefordert (139). Sie konnten eine erhöhte NADH-Atmung nach Kälteadaptation beobachten, die durch Rotenon und Antimycin A nicht gehemmt wurde. Allerdings mußten die Versuchstiere kurz

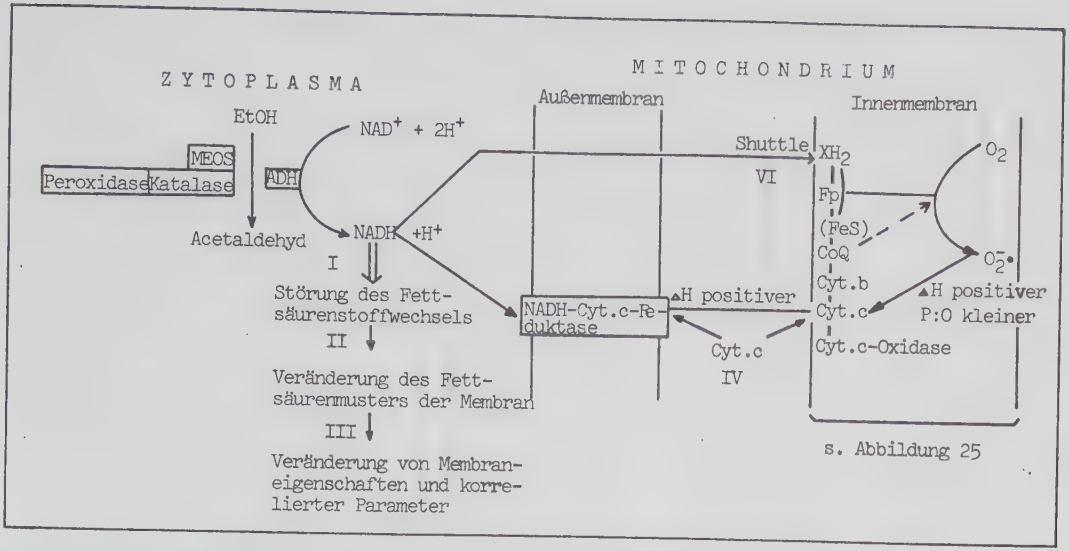


Abb: 26 Schematisierte Abbauwege des Alkohols

vor Versuchsbeginn etwa eine Viertelstunde lang erneutem Kältestreß ausgesetzt sein. Ansonsten war die oben beschriebene NADH-Atmung nicht zu beobachten. Mit chronischen Alkoholgaben ließen sich diese Ergebnisse so nicht erhalten (Tab. 14). Möglicherweise fehlt es auch hier an einem Effektor ähnlich dem oben beschriebenen. Zudem muß angenommen werden, daß Cytochrom c durch die Isolation ausgewaschen wird, was Tab. 15 bestätigt. Eine Hemmung der normalen Atmung ist aber noch nicht feststellbar, denn Zugabe von Cytochrom c führt auch nach Alkohol zu einer gleich starken Atmungsstimulierung wie unter Kontrollbedingungen (Tab. 14). Darüberhinaus ist der Einfluß der mitochondrialen Außenmembran noch völlig unbekannt.

Immerhin ließ sich aber in ersten Versuchen mit Albuminfluoreszin eine dynamische atmungsabhängige Mobilität des Cytochrom c feststellen (nicht gezeigt). Dies geht wesentlich über die Annahme von nur zwei mehr statischen Affinitätskonstanten für oxidiertes und reduziertes Cytochrom c hinaus, wie sie von Vanderkooi et al. bestimmt wurden (131).

4.1.3.2. Die Bedeutung der Abnahme des ACR nach chronischen Alkoholgaben

Zwei Aspekte der Abnahme des ACR müssen hier betrachtet werden:

1. Wie es scheint, führt der Anfall größerer Mengen von Reduktionsäquivalenten zu Veränderungen des Fettsäurenstoffwechsels (I der Abb. 26; s. Diskussion). Diese resultieren in Veränderungen der Fettsäurenzusammensetzung der Membran (II der Abbildung 26; s. 3.4.), (75).

   In ihrem Lipidaufbau veränderte Membranen haben erwartungsgemäß unterschiedliche physikalische Parameter und auch die Membranproteine werden davon mehr oder weniger stark betroffen (s.3.3.). Die Entwicklung der Protonenpermeabilität ist dem ACR korreliert (s. 3.3.1. mit den dort angegebenen Einschränkungen). Daraus folgt, daß nach chronischen Alkoholgaben die Reoxidation des NADH verstärkt ist aufgrund der geringeren energetischen Kopplung der Mitochondrien. Die Shuttle für NADH treten dabei nicht als begrenzende Faktoren hervor (132), (VI in Abb. 26). Im einzelnen kann allerdings nicht unterschieden werden, in welchem Maße Weg IV oder VI beschritten wird.

2. Theoretisch gesehen eröffnet der in Abbildung 25 dargestellte Kurzschluß des Elektronenflusses (IV: vordere Glieder der Atmungskette $\longrightarrow O_2^{-\bullet} \longrightarrow$ Cytochrom c Fe^{3+}) die Möglichkeit, die experimentell immer als zu niedrig von den theoretischen Werten abweichenden P:O zu erklären. Daraus wäre zu folgern, daß dieser Seitenweg der Atmung, der vollständig in der Membran abläuft, auch üblicherweise unter in vivo Bedingungen einen bestimmten Anteil des Abbaus von Reduktionsäquivalenten vermittelt.

4.1.4. Hypoxie und Alkohol

Dem Cytochrom c als einem Vermittler des Abbauwegs IV (Abb. 26) und als Akzeptor von Radikalelektronen (Abb. 25) kommt somit entscheidende Bedeutung zu. Abbildung 27 zeigt noch einmal zusammengefaßt, daß Cytochrom c sowohl durch den NADH-Cytochrom c-Reduktaseweg (falls er einen wesentlichen Beitrag für die NADH-Reoxidation liefert), als auch über den $O_2^{-\bullet}$ Cytochrom c-Kurzschluß reduziert wird. Damit sinkt die Fähigkeit ab, darüberhinaus als Quencher der LPO zu fungieren. Die Tabellen 10 und 11 zeigen dies ganz deutlich: Die starke Statusabhängigkeit der LPO mit Ascorbinsäure wird auf die größere Abfangquote für Radikale im Status 3 zurückgeführt. Zugabe von TMPD verhindert die Radikalbildung fastganz. TMPD scheint aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials selbst nicht zur $O_2^{-\bullet}$ Bildung befähigt zu sein . Ähnliches Verhalten zeigt NADH, das nachweislich über die Cytochrom c-Reduktase oxidiert werden kann (Tab. 14).

Da die Messungen der Tabelle 10 mit Succinat durchgeführt wurden und dieses den Elektronenfluß monopolisiert, zeigt die auf das 3fache gesteigerte LPO nach NADH im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne NADH die verringerte Fähigkeit des Cytochrom c an, $O_2^{-\bullet}$ Radikale der Reaktion I (Abb. 27) zu löschen; zu beachten bleibt aber die Fähigkeit von NADH zur Radikalbildung (NAD•; s. Seite 39). (Die Wirkung von NADPH ist weniger klar, da es Effektor der mikrosomalen LPO ist. Auffallend ist aber auch hier die starke Status-Abhängigkeit.)

Wilson et al. (133) zeigten, daß der Reduktionsgrad des Cytochrom c über den gesamten physiologischen O_2-Konzentrationsbereich von der O_2-Konzentration abhängig ist. Im kontrollierten Zustand nimmt die Cytochrom c Fe^{3+}-Konzentration von Luftsättigung bis $O_2 \longrightarrow 0$ ständig ab.

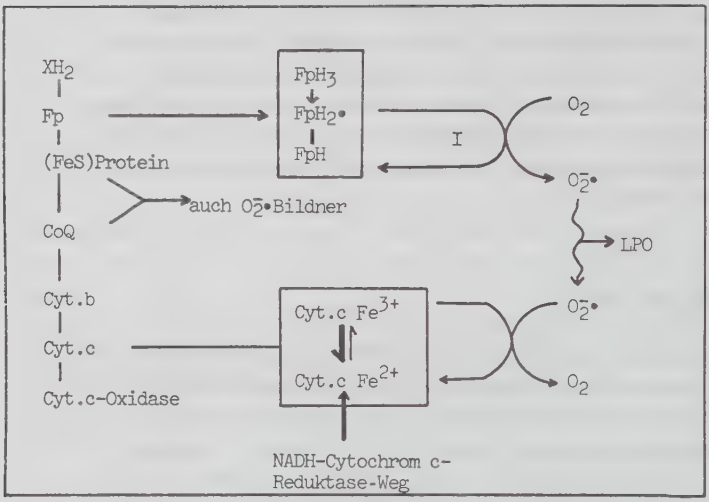


Abb: 27 Elektronenkurzschluß in der Atmungskette und Funktion von Cytochrom c Fe^{3+} als Radikalfänger
Alle gezeigten Reaktionswege laufen in der Membran ab.

Die Reaktion:
NADH + 2 Cytochrom c Fe^{3+} +2ADP+2P_i $\rightleftharpoons$ NAD^++2 Cytochrom c Fe^{2+}+2ATP
befindet sich in fast vollständigem Gleichgewicht:

$$K_{eg}=\frac{(NAD^+)}{(NADH)} \times \left(\frac{(\text{Cytochrom c } Fe^{2+})}{(\text{Cytochrom c } Fe^{3+})}\right)^2 \times \left(\frac{(ATP)}{(ADP)(P_i)}\right)^2$$

Das erfordert bei Abnahme des ATP-Gehalts (festgestellt nach chronischen Alkoholgaben) und Zunahme von NADH (auch Folge chronischer Alkoholgaben) eine Zunahme von Cytochrom c Fe^{2+}. Daraus ist zu schließen, daß hypoxische Zustände zu vermehrter LPO führen müssen, da weniger Cytochrom c Fe^{3+} als Radikalfänger zur Verfügung steht. Dies ist der Fall, wie Abbildung 14 zeigt: Je niedriger die Sauerstoffkonzentration, desto stärker dominiert die LPO. Dies geschieht allerdings erst bei O_2-Konzentrationen von 1µM (scheinbarer K_M-Wert der Cytochrom c-Oxidase für O_2) und kleiner. Bei Sauerstoffüberschuß fällt der Seitenweg der LPO nicht nennenswert ins

Gewicht.

Hypoxie kann die LPO verstärken (s.o.) und sie kann bei chronischen Alkoholgaben vorkommen. Hier wurde schon von Quistorff et al. (134) gezeigt, daß die Steilheit desschon in normoxischer Leber existierenden periportal-zentrolobulären Redoxgradienten (23) durch Alkohol erheblich verstärkt wird. Dies erklärt sich aus dem erhöhten O_2-Verbrauch nach chronischen Alkoholgaben.

Hypoxie führt bei verschiedenen Organen zu einer drastischen Verminderung des ACR (135, 136) und eine Erhöhung der Lysophosphatide wurde beobachtet (137). In Muskel und Leber wurde nach hypoxischen Zuständen, die z.B. beim Muskel nach Belastung auftreten, vermehrt Thiobarbitursäurereaktives Material gefunden (138). Hypoxieschäden können beim hypoxisch perfundierten Herzmuskel durch α-Tocopherol vermindert werden (139). Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen, daß die Veränderungen nach Hypoxie reversibel sind und erst bei länger andauernder Einwirkung irreversibel werden und schließlich zur Nekrose der Zelle führen können.

Die Zelle scheint auf hypoxische Zustände in der Weise zu reagieren, daß morphologisch statt einiger großer Mitochondrien, mehrere kleine gebildet werden (weniger und größere Mitochondrien im periportalen Bereich des Leberläppchens, aber zentrolobulär mehr und kleinere Mitochondrien (140)). Dadurch werden die O_2-Diffusionsstrecken herabgesetzt und simultan wird wegen der 10fach höheren O_2-Löslichkeit in der Mitochondrienmembran (persönliche Mitteilung E. Lengfelder, München) der O_2-Gradient verstärkt, d.h. daß individuelle Mitochondrien noch hinreichend mit O_2 versorgt werden oder anaerob bleiben.

Die Tabelle der Abbildung 14 zeigt bei niedrigem O_2-Druck eine Bildungsrate für MDA von etwa 0,5nMol/1,5mg Prot./7min. Nach überschlagsmäßiger Abschätzung kommen auf 1,5mg mitochondriales Protein etwa 190nMol peroxidierbare Fettsäuren der Innenmembran; im wesentlichen Linol-, Arachidon- und Docohexaensäure). Man ersieht aus dem Vergleich beider Zahlen, daß eine Hypoxie lange andauern muß, um zu irreversibler Schädigung zu führen. Darüberhinaus existieren Schutzmechanismen, deren Funktion allerdings eingeschränkt sein kann (s. Allgemeine Diskussion).

4.2. ALLGEMEINE DISKUSSION

4.2.1. Bemerkungen zur Bestimmung des ACR

Der Atmungskontrollquotient wurde hier als direkter Parameter der Membranintegrität bestimmt. Dabei ist daran zu denken, daß die Membran Angriffspunkt stimulierender und hemmender Agentien ist. Summation dieser Einflüsse ist eine sich in dynamischer Wandlung begriffene Membran, deren Eigenschaften durch entsprechende Integritätsparameter meßbar werden (s. 2.2.4.1.). In vivo Faktoren, die die Membraneigenschaften beeinflussen und die hier besprochen werden sollen, sind

1. die Ernährung
2. der hormonale Status und
3. Umwelteinflüsse

Zu 1: Modifikation der Nahrung führt zu Membranveränderungen (s. 3.4.). Dies wurde festgestellt für verschiedene Organellen nach unterschiedlicher Ernährung. Die Diäten waren insbesondere in ihrem Fettanteil verändert und sie wurden mit und ohne Alkohol gegeben (139,141,137,142,143,144,145 u.a.). Hosein et al. (146) stellten nach chronischen Alkoholgaben in Ghosts von Mitochondrien die Abnahme der "lipid phase transition"-Temperatur von 18,5±0,2 auf 15,8±0,3°C fest.

Die nach Diät oder Alkohol beobachtete Veränderung der Fettsäurenzusammensetzung ist bei den Untersuchern nicht einheitlich. Die meisten zeigen aber sowohl bei Verfütterung stärker gesättigter Fettsäuren als auch nach chronischen Alkoholgaben eine Abnahme der Arachidonsäure und Zunahme der Linolsäure. Dies ist gleichzusetzen mit Erhöhung des Sättigungsgrades und Verkürzung der Kettenlänge.

Es wurde von Sun und Sun gezeigt (141), daß sich bei Abnahme hochungesättigter Fettsäuren in den Membranen von Mitochondrien der P:O-Quotient erniedrigte. Daraus kann geschlossen werden, daß die gemessenen ACR eine verringerte Membranintegrität widerspiegeln.

Die Abnahme des ACR wurde auch von Koch et al. (147) und Banks et al. (148) beobachtet. Cederbaum et al. (132) stellten sie nur für NADH-abhängige Substrate fest, nicht für Succinat. Israel et al. (149) fanden keine Veränderungen, was aber wahrscheinlich der Methode angelastet werden muß. Haslam et al. (150) fanden bei Zunahme des Sättigungsgrades der Fettsäuren eine Zunahme der Protonenpermeabilität (entspr. Abb. 16) und Verlust des aktiven Kationen-Transportes für K^+ (entspr. Abb. 21).

Die Diskrepanz, daß Mitochondrien weiblicher Ratten unter Kontrollbedingungen geringere Protonenleckpermeabilität bei erniedrigten ACR zeigen, könnte aus einem geringeren elektrischen Potential ϕ bei diesen Mitochondrien herrühren, denn nach

$$\Delta\mu = \mu' - \mu'' = RT \cdot \ln \frac{a'}{a''} + zF\,(\phi' - \phi'')$$

μ: elektrochemisches Potential
a: Aktivität außer^{1}- und innerhalb^{11} des Mitochondriums
z: Wertigkeit des membrangängigen Ions

ergibt sich das elektrochemische Potential aus dem Massenpotential (a' und a'') für H^+ und dem elektrischen Potential (ϕ' und ϕ'') der Membran. Im Gleichgewicht ($\Delta\mu=0$) entspricht der Ausdruck ($\phi' - \phi''$) den Membranpotentialen. Diese zeigt Tabelle 12. Für Mitochondrien weiblicher Ratten läßt sich keine erwartete Abnahme erkennen. Es kann hier somit keine befriedigende Erklärung gegeben werden (s. auch 3.4. und Bemerkung auf Seite 72).

Zu 2: Verschiedene Hormone beeinflussen den Aufbau biologischer Membranen. Bekannt ist dies für Thyroide (s. 151,152) und auch für Östradiol und Testosteron (s.u.). Thyroide wirken auf die Fettsäurenzusammensetzung und damit die Membranpermeabilität. Östradiol und Testosteron beeinflussen u.a. die Biosynthese von Phosphatidylcholin.

Alkohol seinerseits wirkt bei der Ratte auf die Ausschüttung thyreotroper Hormone im Sinne einer Stimulation und auf Östradiol- und Testosteronabgabe im Sinne einer Hemmung (153,154). Für den letzten Fall bedeutet dies eine Abnahme der Menge an Arachidonsäure und eine Zunahme der Linolsäure, wie festgestellt wurde. Männliche Ratten sind stärker betroffen als weibliche, was sich auch in den Versuchsergebnissen für die Protonenpermeabilität (s. 3.3.1.), die Calciumaufnahme und -wiederabgabe (s. 3.3.2.) und die Kaliumaufnahme und -wiederabgabe (s. 3.3.3.) andeutet.

Gaben von Alkohol erniedrigen das ATP-Angebot (155), das sich in der Verringerung des Phosphorylierungpotentials manifestiert. Da die Desaturation und Elongation von Fettsäuren von der ATP-Menge abhängt, sinkt die Syntheserate langkettiger ungesättigter Fettsäuren.

In dem oben beschriebenen Mechanismus dürfte auch die Geschlechtsabhängigkeit des ACR begründet sein, die auch bei Mäusen (Stamm: MNRI) festgestellt wurde (nicht gezeigt). Andere Untersucher fanden bei Mäusen anderer Stämme keine einheitlichen Ergebnisse (156). Eine Spezies- und Organabhängigkeit des ACR ist durchaus denkbar.

Zu 3: Zu den Umwelteinflüssen sollen der Streß und Kälte gerechnet werden. Beide können Membranen beeinflussen:

Streßsituationen erhöhen die Plasmakonzentration von Ca^{2+} aufgrund der Wirkung des Parathormons. Mitochondrien können als Puffer überschüssige Ca-Mengen vorübergehend speichern. Bei Erhöhung der Ca-Konzentration ist Aktivierung von bestimmten Phospholipasen festgestellt worden (157,158). Auch chronische Alkoholgaben erhöhen die Sekretion von Parathormon (159). Damit beginnt eine Lipolyse der Membran, die unter anderem zu Lysophosphatiden führt, die ihrerseits Effektoren von Phospholipasen sind.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß Immobilisationsstreß bei der Ratte den Alkoholabbau erhöht (160). Erhöhte Atmung aufgrund Veränderungen der Mitochondrienmembran ist wohl die Ursache.

Kälteakklimatisation führt nachgewiesenermaßen zu einer adaptativen Veränderung der Membran hinsichtlich ihres Fettsäurenaufbaus. Der Anteil der ungesättigten Fettsäuren wird erhöht (161,162). Die Ergebnisse sind allerdings nicht ganz konsistent, denn Mitochondrien zeigen nach Kälteakklimatisation erniedrigte P:O-Quotienten (163).

Es zeigt sich hier allerdings eine Diskrepanz in der Korrelation von Sättigungsgrad mit dem ACR oder P:O. Es wurde gezeigt, daß Erhöhung des Anteils der gesättigten Fettsäuren in der Membran zur Erniedrigung des P:O führt (164). Erhöhung der ungesättigten Fettsäuren bei der Kälteakklimatisation hat jedoch die gleiche Wirkung (s.o.)! Diesen scheinbaren Widerspruch kann man vielleicht aus den unterschiedlichen Auswirkungen einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die Packungsdichte der Phospholipide auflösen (s. Seite 70). Einfach ungesättigte Fettsäuren, in aller Regel cis-Isomere, bewirken die stärkste Abknickung der Fettsäuren aus der Anordnung der Ketten senkrecht zur Membranoberfläche von der Doppelbindung abwärts und damit starke Auflockerung der Packung. Bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist die Abweichung von der senkrechten Ausrichtung nur noch gering, d.h. entscheidend ist die relative Änderung an ungesättigten Fettsäuren.

Andere Faktoren der in vivo Betrachtungen sind jahreszeitliche und circadiane Rhythmen, sowie das Alter (s.165).

In vitro Faktoren, die den ACR beeinflussen, sind:

1. die Bedingungen der Isolation
2. die Alterung der Mitochondrien
3. die Bestimmung selbst.

Zu 1: Für die Isolation (angegeben in 2.2.1.) wichtig ist der Ausschluß von Ca^{2+} (s.o.) und Verlust von Cytochrom c durch Schwellung.

Zu 2: Mitochondriale Suspensionen unterliegen aufgrund lytischer und oxidativer Prozesse einer Alterung. Auf Dithioerythrit (Hemmer der HS-Gruppen-Oxidation) wurde verzichtet, da Interferenz mit experimenteller LPO befürchtet wurde. Spontane LPO findet wahrscheinlich nicht statt, da der Sauerstoff fehlt (anaerobe Suspension). Die Wirkung der Lysophosphatide läßt sich durch Bindung an Albumin hemmen. Allerdings ist unklar, welche Rolle Albumin hinsichtlich seiner Fähigkeit spielt, Cytochrom c zu binden. Aus diesem Grunde wurde es nicht benutzt.

Zu 3: Bei der Bestimmung, angegeben in 2.2.4.1., muß die Beobachtung beachtet werden, daß die Atmungsraten abhängig sind von der eingesetzten Proteinmenge. Sie steigen mit kleiner werdender Proteinmenge an. Dies findet seinen Niederschlag in den resultierenden ACR (Tab. 1). Der Grund für dieses Verhalten ist unbekannt. Er könnte aber in der Tatsache liegen, daß bei größerem O_2-Verbrauch durch mehr Mitochondrien die Messung bei großen Proteinmengen bei relativ geringer O_2-Konzentration und damit erhöhter Cytochrom c-Reduktion und verringerter Energetisierung stattfindet (s.133).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß jeder ACR bei entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen ein Abbild des jeweiligen Zustandes der Mitochondrienmembran sein kann. Dabei ist er als individuelle Größe aufzufassen, so daß eine Mittelwertbildung fraglich erscheinen muß. Gefordert werden muß dagegen Konsistenz innerhalb einen Versuches, der eine möglichst kurze Laufzeit haben sollte.

4.2.2. Bemerkungen zur Bestimmung der LPO

Auf die Probleme bei der exogen induzierten LPO wurde schon in 4.1.1. hingewiesen. Darüberhinaus sollen noch folgende Punkte angesprochen werden:

1. Mitochondrien sind zur Entfaltung ihrer physiologischen Atmungsaktivität auf Phosphat angewiesen. Größere P_i-Mengen senken allerdings die LPO (nicht gezeigt), weil wahrscheinlich der Fe^{2+}/P_i-Komplex eine andere Affinität zur Membran besitzt als der Fe^{2+}/ADP-Komplex (s. 4.1.1.).

Das bedeutet, daß den Inkubationen für den Status 3 entweder sehr viel P_i zugesetzt oder daß mehrmals P_i nachgegeben werden muß. Im ersten Fall ist die LPO klein, so daß es vorteilhafter erschien, mit einer kleinen Menge P_i zu inkubieren (Variante A). Das Phosphat wird zwar durch Atmung bis auf Reste entfernt (ADP wird phosphoryliert), aber mit Abnahme der P_i-Konzentration steigt die LPO und wirkt so dem Trend z.B. des Status 4 $\longrightarrow$ Status 3-Übergangs entgegen. Der zweite Fall wurde in Variante B verwirklicht:
Die Tabellen 6 und 8 zeigen deutlich, daß die nach beiden Varianten erhaltenen Werte konsistent sind.

2. ADP wird während der Inkubation durch ATP ausgetauscht. ATP hat sicher andere Komplexbildungskonstanten für Fe^{2+}. Das heißt, die Initialradikalbildung ist zu verschiedenen Zeiten unterschiedlich. Es ist zu vermuten, daß sie abnimmt aufgrund des im Vergleich zum ADP stärker negativen ATP/Fe^{2+}-Komplexes.

3. Inkubation der Mitochondrien führt unter den gewählten Bedingungen zur Schwellung (nicht gezeigt). An anderer Stelle wurde gezeigt, daß Schwellung zum Verlust von Phospholipiden führt (166). Das bedeutet, daß eine zu lange Inkubationsdauer die LPO verringern muß, da eine Desintegration mitochondrialer Membranen herbeigeführt wird. Insofern erscheint es nicht verwunderlich, daß Baumgartner et al. (167) keine Korrelation zwischen der Abnahme der Atmungsaktivität gemessen über 3 h(!) und der entsprechenden LPO feststellen konnten. Auch Änderung der Atmung selbst durch Manipulation mit Substraten und Akzeptoren wurde nicht durchgeführt.

4. Die O_2-Versorgung ist vor und nach Aliquot-Entnahme unterschiedlich, da sich die Diffussionsstrecken verkleinern. Obwohl die O_2-Konzentration immer "ausreichend" war (sie sank wie unter 1/3 der Luftsättigung), ergibt sich eine relative Zunahme der LPO bei Abnahme der Diffusionsstrecken. Bei einer Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der LPO läßt sich dies erkennen (nicht gezeigt). Ursache ist möglicherweise die bei Erhöhung des O_2-Druckes beobachtete gesteigerte Energetisierung der Mitochondrienmembran. Einer erhöhten Energetisierung aber folgt Zunahme der LPO (s. 3.2.1.5. und 3.2.1.6.1.).

5. Alle Inkubationen wurden mit der Zugabe der mitochondrialen Suspension gestartet. Dadurch ergibt sich für den Beginn eine Änderung des Energie-

status der Mitochondrien, denn diese werden immer aus einem anaeroben Status in einen andern überführt. Die dadurch bedingte Inkonsistenz in der Ausbildung der LPO wurde in Kauf genommen, da sie als gering angesehen wird im Vergleich zur Gesamt-LPO.

4.2.3. Bedeutung der LPO für membranale Veränderungen

Es kann nicht bestritten werden, daß die LPO auch im physiologischen Reaktionsablauf trotz aller Schutzmechanismen (s.u.) vorkommt und auch ihren Sinn hat (z.B. $O_2^{-}\cdot$ Bildung bei der Phagozytose und Prostaglandinsynthese). Das Lipofuscin gilt als in vivo Produkt peroxidativer Prozesse, (s. 168). Es soll Kondensationsprodukt (Schiff'sche Base) von MDA mit den Aminogruppen von Proteinen und Nucleinsäuren sein. Nachgewiesenermaßen produzieren Granulozyten bei der Phagozytose $O_2^{-}\cdot$ Radikale (S.169). Möglicherweise dienen diese der Unschädlichmachung der fremden Zelle. Neben dieser sozusagen als Untergrund vorhandenen LPO gibt es aber auch Situationen erhöhter LPO. Dazu gehört möglicherweise der Alkohol, der bei chronischer Applikation die Untergrundrate erhöht, und dazu gehört sicher auch Hypoxie.

Die Belastung durch Alkohol ist langandauernd unter chronischen Bedingungen, so daß eine Reaktion des Organismus in Form veränderter Fettsäuren erfolgt, die die Belastung in gewissen Grenzen auszugleichen vermag (Adaptation, s. 4.2.4.).

Hypoxische Zustände dagegen scheinen zu akuten Veränderungen zu führen: Zelluläre und auch mitochondriale Enzyme (z.B. Glutamatdehydrogenase) können extrazellulär nachgewiesen werden. Das bedeutet für den letzten Fall, daß die Mitochondrienmembran durchlässig geworden ist. Möglicher Mechanismus könnte die LPO sein, denn bei in vitro Versuchen ließ sich nach Peroxidation von Mitochondrien Enzymaustritt beobachten (170). Vesikuläre Membranen zeigten nach Peroxidation erhöhte Permeabilität (171), Liposomen zeigten nach Photoperoxidation größere Protonenpermeabilität (172), Lipide eine erhöhte Rigidität (173), und bei Mitochondrien veränderten $O_2^{-}\cdot$ Radikale die Energiekonservierung und oxidative Phosphorylierung (174). Linolsäurehydroperoxide können Mitochondrien entkoppeln (175), (s. dazu auch die Entwicklung des ACR: 3.1.2.).

Ein anderer Mechanismus könnte auch über die Aktivierung von Ca^{2+} vonstatten gehen, wobei die LPO möglicherweise auch Ursache der veränderten Membranpermeabilität für Ca^{2+} ist. Die Unfähigkeit der deenergetisierten

mitochondrialen Membran (verändert durch LPO?) zusätzliche durch niedrige O_2-Drucke freigesetzte Ca^{2+} Mengen aus dem Zytosol zu entfernen, führt zu einem Anstieg der freien zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration: Dies hat die Aktivierung von Phospholipasen mit den schon beschriebenen Reaktionen zur Folge (s.176). Bei Ischämie im Myocardgewebe wurden vermehrt Lysophosphatide festgestellt (177).

Schutzmechanismen gegen oxidative Prozesse in der Zelle sind vielfach vorhanden (es werden nur die im Zusammenhang mit chronischen Alkoholgaben relevanten aufgeführt): Das Zytosol enthält einen Lipidperoxidation-Inhibitor (LPI) (178,179), der durch Carbohydratfütterung induziert werden kann und mit Glutathion-Peroxidase nicht identisch ist. Die SOD kann induziert werden, ebenso wie GSH-Peroxidase und-Reduktase, wie es nach chronischen Alkoholgaben der Fall ist (93). GSH spielt als Antioxidant neben Substanzen der Klasse des Vitamin E eine sehr wichtige Rolle. Es wird mit Hilfe von NADPH reduziert, wobei NADPH im Zytosol aus dem Pentosephosphat-Shunt und in den Mitochondrien aus der energieabhängigen Transhydrogenase-Reaktion stammen kann. Letztere ist sehr interessant, denn ein Absinken der zur Verfügung gestellten Energie wirkt sich ungünstig auf die Gleichgewichtslage des NADPH/NADH-Systems und damit auch auf den GSH-Spiegel aus. Da die Leberzelle im Zytosol ungefähr 5,7µMol GSH/g Leber enthält,kann man aufgrund dieser großen Menge auf eine starke Redoxpufferkapazität schließen.

4.2.4. Membranveränderungen nach chronischen Alkoholgaben

Chronische Alkoholgaben wirken auf den Membranaufbau

1. über Beeinflussung der membranbildenden Reaktionswege (dazu gehören auch Proteine) und
2. über verstärkte LPO

Die Veränderung der Membran selbst und die dadurch geänderten Eigenschaften wurden im Praktischen Teil dokumentiert. Zudem wurde eine verringerte Proteinbiosynthese festgestellt (148), deren Folgen nur ungenau am Atmungsverhalten abgeschätzt werden können.

Die LPO scheint nach chronischen Alkoholgaben dadurch erhöht zu sein, daß Hypoxie verstärkt auftritt,wie sie schon bei normoxischer Leber, insbesondere aber nach chronischen Alkoholgaben, vorliegt.

Die antioxidative Kapazität ist verringert, da die für reduktive Prozesse notwendige Energie als Wärme verlorengeht. Bei geringerer Effizienz

der Atmung folgt ein Absinken der ATP-Konzentration, was auch zur Aktivierung von Phospholipasen führt (180) mit den daraus sich ergebenden Konsequenzen.

Die in Abbildung 4 festgestellte geringere Suszeptibilität mitochondrialer Membranen nach Alkohol gegenüber LPO kann als Adaptation auf erhöhte peroxidative Belastung gedeutet werden, denn sie wirkt dieser Belastung entgegen.

In Kauf genommen werden muß damit allerdings eine Reihe anderer Veränderungen, die aber längere Zeit reversibler Natur zu sein scheinen. Erst in einem zweiten Stadium führen dann langsam irreversible Prozesse zur Schädigung. Dazu gehören unter anderem die über das normale hinausgehende Vernetzung peroxidierter Lipide, die Vernetzung von MDA mit Proteinen und DNA (181,182) und der direkte über die Lipidumgebung beeinflußte, peroxidative Angriff auf Proteine (183).

Erwähnt sei schließlich noch, daß die o.g. Mechanismen auch für eine Theorie des Alterns herangezogen werden (184, s. 185 s. 186), und daß MDA zumindestens bei kultivierten Lymphomazellen eine mutagene und cytotoxische Potenz besitzt (187).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Änderungen mitochondrialer Parameter nach LPO und chronischen Alkoholgaben:

1. Der Atmungskontrollquotient (ACR):
   - Chronische Alkoholgaben führen bei Lebermitochondrien männlicher und weiblicher Ratten zu einer Abnahme des ACR, was einer verringerten energetischen Kopplung entspricht.
   - Verfütterung eines stark erhöhten Anteils gesättigter Fettsäuren führt ebenfalls zur Abnahme des ACR.
   - Lebermitochondrien weiblicher Ratten zeigen niedrigere ACR als die männlicher Ratten.

2. Die Lipidperoxidation (LPO):
   Die mitochondriale Lipidperoxidation wurde verstärkt durch Fe^{2+}/ADP-Zusatz und über die Malondialdehydentstehung gemessen:
   - Entstandenes Malondialdehyd wird in Gegenwart von Succinat in mitochondrialen Suspensionen nicht veratmet und ergibt reproduzierbare Werte für die LPO.
   - Die Suszeptibilität mitochondrialer Membranen gegenüber exogen induzierte LPO erwies sich nach chronischen Alkoholgaben als verringert.
   - Verfütterung eines erhöhten Anteils gesättigter Fettsäuren statt der sonst üblichen ungesättigten Fettsäuren führte ebenfalls zur Abnahme der LPO.
   - LPO und ACR zeigen sich streng korreliert: Die LPO erniedrigt sich bei Abnahme des Kopplungsgrades. Dies gilt auch für den Übergang der Status 4 in die Status 3-Atmung.
   - Zugabe von Entkopplern zu mitochondrialen Suspensionen führt in konzentrationsabhängiger Weise zur Abnahme der LPO. Manche Entkoppler zeigen allerdings ein atypisches Verhalten, in dem sie in bestimmten Konzentrationsbereichen die LPO unterdrücken oder verstärken können.
   - Inhibitoren der Atmungskette ebenso wie Anionen und Kationen beeinflussen die LPO in charakteristischer Weise; Inhibitoren verändern den Elektronenfluß und den Redoxzustand bestimmter Atmungskettenkomponenten. Daraus resultiert veränderte Initialradikalbildung, was durch Messung der Chemilumineszenz gezeigt wird. Analog der Erhöhung der negativen Oberflächenladungsdichte bei Energetisierung der Mitochondrien durch Atmung wird diese durch amphiphile Anionen

erhöht und durch Kat/ionen erniedrigt und entsprechend die LPO erhöht bzw. erniedrigt.

- Stark erniedrigte O_2-Konzentrationen (1nM-2µM) führen zur relativen Zunahme der LPO. Diese wird einer Gleichgewichtsverschiebung des Cytochrom c Fe^{3+}/Fe^{2+} zugeschrieben, das in der unter niedrigem O_2-Druck vorliegenden reduzierten Form nicht als Radikalfänger der LPO wirken kann.

3. Weitere Änderungen mitochondrialer Parameter nach chronischen Alkoholgaben:
   - Die Protonenleckpermeabilität ist nach chronischen Alkoholgaben bei Mitochondrien männlicher und weiblicher Ratten erhöht. Sie ist auch stark erhöht nach verstärkter Verfütterung gesättigter Fettsäuren statt üblicher Fettsäurengemische. Mitochondrien weiblicher Tiere zeigen geringere Protonenleckpermeabilität als die männlicher.
   - Die energieabhängige Fähigkeit von Mitochondrien zur Ca^{2+}-Akkumulation ist nur bei männlichen Ratten nach Alkoholvorbehandlung und nach Verfütterung gesättigter Fettsäuren erniedrigt.
   - Der Transport von K^+ ist nach chronischen Alkoholgaben und Verfütterung von gesättigten Fettsäuren wie beim Ca^{2+} verändert.
   - Das Membranpotential ist deutlich nur nach Verfütterung gesättigter anstelle ungesättigter Fettsäuren erniedrigt.
   - Chronische Alkoholgaben führen nur bei Mitochondrien männlicher Ratten zur Hemmung der Status 4- und Status 3-Atmung mit Succinat und ß-Hydroxybutyrat. Mitochondrien weiblicher Ratten zeigen höhere endogene, Status 4- und Status 3-Atmung als Mitochondrien männlicher Ratten.
   - Männliche Ratten reagieren auf Alkoholexposition mit starker Gewichtsabnahme, weibliche nicht.
   - Männliche Ratten haben nach chronischer Alkoholexposition einen wesentlich höheren Energieverbrauch als die mit Saccharose gefütterten Kontrollen. Weibliche Ratten zeigen mit und ohne Alkohol identischen Energieverbrauch.
   - Chronische Alkoholgaben führen bei Mitochondrien männlicher Ratten mit Standarddiät zur Abnahme des Anteils der Arachidon-, Öl- und Stearinsäure, dagegen zur Zunahme von Palmitin- und Palmitoleinsäure. Palmindiät ohne und mit Alkohol löst gleichsinnige Veränderungen aus mit der Besonderheit, daß zusätzlich

starke Abnahme von Linolsäure und Zunahme von Ölsäure beobachtet wird.

Der Anteil von Linol- und Arachidonsäure ist erniedrigt bei weiblichen Tieren unter Standarddiät ohne Alkohol. Chronische Alkoholgaben, zusätzlich gegeben, erhöhen im wesentlichen nur den Anteil der Linolsäure. Palmindiät beeinflußt den Fettsäurenaufbau bei weiblichen Tieren kaum. Gleiches gilt für zusätzliche Alkoholgaben.

6. LITERATUR

1 Thaler, H. (1962)
Virchow's Arch. Path. Anat. 335, 180

2 Eisenburg, J. (1976)
Naturwissenschaften 63, 556

3 Hartroft, W.S. (1962)
in: Aktuelle Probleme der Hepatologie (Edit: Martini, G.A.)
G. Thieme, Stuttgart, p. 53

4 Lieber, C.S. & Schmid, R. (1961)
J. Clin. Invest. 40, 394

5 Lieber, C.S., Lefevre, A., Spritz, N., Feinmann, L. & De Carli, L.M. (1967)
J. Clin. Invest. 46, 1451

6 Thurman, R.G. & Scholz, R. (1977)
Eur. J. Biochem. 75, 13

7 Lieber, C.S. (1975)
Annals N.Y. Acad. Sci. 252, 24

8 Di Luzio, N.R. (1968)
Expl. Mol. Pathol. 8, 394

9 Comporti, M., Burdino, E. & Raja, F. (1971)
Life Sci. 10, 855

10 Lieber, C.S. & De Carli, L. (1968)
Science 162, 917

11 Lieber, C.S. & De Carli, L.(1970)
Life Sci. 9, 267

12 Vatsis, K. & Coon, M.J. (1977)
in: Alcohol & Aldehyde Metabolizing Systems (Edit: Thurman, R.G.,
Drott, H., Williamson, J.R. & Chance, B)
Vol. II,Academic Press, N.Y. p. 307

13 Scholz, R. Hansen, W. & Thurman, R.G. (1971)
in: Metabolic Changes Induced by Alcohol (Edit: Martini, G.A., Bode, Ch.)
Springer Verlag, Berlin, p. 101

14 Thurmann, R.G., Mc Kenna, W.R. & Mc Caffrey, T.B. (1976)
Mol. Pharmacol. 12, 156

15 von Wartburg, J.P. & von Röthlisberg, M. (1961)
Helvet. Physiol. Pharmacol. Acta 19, 30

16 Ugarte, G., Pino, M.E. & Insunza, I. (1967)
Amer. J. Dig. Dis. 12, 589

17 Asada, M. & Galambos, J.T. (1963)
Gastroenterology 45, 67

18 Figueroa, R. & Klets, A.P. (1962)
Am. J. Clin. Nutr. 11, 235
19 Figueroa, R. & Klotz, A.P. (1962)
Gastroenterology 43, 10
20 Ugarte, G., Pereda, T., Pino, M.E. Lorca, F. & Sepulveda, F. (1967)
Rev. Med. Chile 95, 67
21 Videla, L. & Israel, Y. (1970)
Biochem. J. 118, 275
22 Pirola, R.C. (1977)
Drug Metabolism & Alcohol
ADIS-Press, N.Y., p. 96
23 Lübbers, D.W. (1968)
in: Biochemie des Sauerstoffs (Edit: Hess, B., Staudinger, Hj.)
Springer Verlag, Berlin, p. 67
24 French, S.W., (1968)
Gastroenterology 54, 1106
25 Mallory, F.B., (1911)
Bull. Johns Hopk. Hosp. 22, 69
26 Di Luzio, N.R. & Harman, A.D. (1967)
Fed. Proc. 26, 1436
27 Mac Donald, C.M., (1973)
FEBS-Letters 35, 227
28Reitz, R.C., (1975)
Biochim. Biophys. Acta 380, 145
29 Koch, O.R., Porta, E.A. & Hartroft, W.S. (1969)
Lab. Invest. 19, 298
30 Porta, E.A., Koch, O.R. & Hartroft, W.S. (1970)
Exptl. Mol. Pathol. 12, 104
31 Klingenberg, M. & Szarkowska, L. (1963)
Biochem. Z. 338, 674
32 Pfaff, E. (1965)
Dissertation Marburg
33 Claret, M. & Mazet, J.L. (1972)
J. Physiol. 223, 279
34 Estabrook, R.W. (1967)
in: Methods in Enzymology (Edit: Estabrook, R.W. & Pullman, M.E.) Vol.X
Academic Press, N.Y., p. 41

35 Chance, B. & Baltscheffsky, M. (1958)
Biochem. J. 68, 283
36 Kohn, H.I. & Liversedge, M. (1944)
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 82, 292
37 Smuckler, E.A., Arrhenius, E. & Hültin, E. (1967)
Biochem. J. 103, 55
38 Niehaus, W.G. Jr. & Samuelson, B. (1968)
Eur. J. Biochem. 6, 126
39 Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. (1957)
J. Biol. Chem. 226, 497
40 Metcalfe, L.D. & Schmitz, A.A. (1961)
Anal. Chem. 32, 363
41 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265
42 Crow, E.L. & Gardner, R.S. (1959)
Biometrika, 46, 441
43 Placer, Z., Veselková, A. & Rath, R. (1965)
Experientia 21, 19
44 Holtkamp, D.E. & Hill, R.M., (1951)
Arch. Biochem. Biophys. 34, 216
45 Recknagel, R.O. & Goshal, A.K. (1966)
Exptl. Mol. Pathol. 5, 108
46 Lindros, K.O., Vihma, R. & Forsander, O.A. (1972)
Biochem. J. 126, 945
47 Recknagel, R.O. & Goshal, A.K. (1965)
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exptl. Biol. 24, 299
48 Schönberg, A. (1958)
Präparative Organische Photochemie
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg
49 Seemann, Ph. (1972)
Pharmacol. Rev. 24, 583
50 Corwin, L.M. (1962)
Arch. Biochem. Biophys. 97, 51
51 Parsons, D.F., Williams, G.R., Thompson, W., Wilson, D. & Chance, B. (1967)
in: Mitochondrial Structure & Compartmentation (Edit: Quagliariello, E., Papa, S., Slater, E.C., Tager, J.M.)
Ariatica Editrice, Bari, p. 29
52 Slawson, V., Adamson, A.W. & Mead, J.F. (1973)
Lipids 8, 129

53 Slater, T.F. & Eakins, M.N. (1974)
in: New Trends in the Therapy of Liver Diseases (Edit: Bertelli, A.)
S. Karger, Basel, p. 84
54 Kieczka, H. (1979)
Dissertation Tübingen
55 Garssen, G.J., Vliegenthart, J.F.G. & Boldingh, J. (1971)
Biochem. J. 122, 327
56 Riely, C.A. & Cohen, G. (1974)
Science 183, 208
57 Di Luzio, N.R. (1973)
Fed. Proc. 32, 1875
58 Ingram, L.O. (1976)
J. Bacteriol. 125, 670
59 Hammer, C.T. & Wills, E.D. (1978)
Biochem. J., 174, 585
60 Packer, L. (1970)
Fed. Proc. 29, 1533
61 Bochenek, W. & Rodgers, J.B. (1978)
Biochim. Biophys. Acta, 528, 1
62 Hanstein, W.G. & Hatefi, Y. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 288
63 Schwenk, M., Burr, R., Baur, H. & Pfaff, E. (1977)
Biochem. Pharmacol. 26, 825
64 Cederbaum, A.I., Lieber, C.S., Toth, A., Beattie, D.S. & Rubin, E. (1972)
J. Biol. Chem. 218, 4977
65 Rawat, A.K. & Kuriyama, K. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 517
66 Pryor, W.A. (1976)
in: Free Radicals in Biology (Edit: Pryor, W.A.) Vol. II,
Academic Press. N.Y., p. 36
67 Kasower, E.M. (1976)
in: Free Radicals in Biology (Edit: Pryor, V.A.) Vol. II,
Academic Press. N.Y., p. 1
68 Jacobs, E.E. & Sanadi, D.R. (1960)
J. Biol. Chemistry 235, 531
69 Chance, B. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 2729

70 Rasmussen, H. & Jensen, P. (1975)
Adv. Cycl. Nucleot. Res. 5, 375

71 Sun, A.Y. & Sun, G.Y. (1976)
in: Function and Metabolism of Phospholipids in CNS and PNS, (Edit: Porcellati, G., Amaducci, L., Galli, C.)
Plenum Press, N.Y., p. 169

72 Binet, A. & Volfin, P. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 170, 576

73 Mc Murchie, E.J. & Raison, J.K. (1979)
Biochim. Biophys. Acta, 554, 364

74 Haslam, J.M. & Fellows, N.F. (1977)
Biochem. J. 166, 565

75 Thompson, J.A. & Reitz, R.C. (1978)
Lipids, 13, 540

76 Svingen, B.A., O'Neal, F.O. & Aust, D.S. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 803

77 Gutteridge, J.M.C. (1977)
Analyt. Biochem. 82, 76

78 Wood, P.M. (1974)
FEBS-Letters 44, 22

79 Ullrich, V. & Staudinger, Hj. (1968)
in: Biochemie des Sauerstoffs (Edit: Hess, B., Staudinger, Hj.)
Springer Verlag, Berlin, p. 229

80 Erecinska, M. & Wilson, D.F. (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 174, 143

81 Hasegawa, K. & Patterson, L.K. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 817

82 Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I. & Stoppani, A.O.M. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 180, 248

83 Loschen, G., Flohé, L. & Chance, B. (1971)
FEBS-Letters 18, 261

84 Pine, A.J. (1978)
Biochem. Pharmacol., 27, 1805

85 Bors, W., Saran, M., Lengfelder, E., Spöttl, R. & Michel, C. (1974)
Current Topics Rad. Res. Quat. 9, 247

86 Mead, J.F. (1976)
in: Free Radicals in Biology (Edit: Pryor, W.A.)
Academic Press, N.Y., p. 51

87 Packer, L., Deamer, D.W. & Heath, R.L. (1967)
Adv. Gerontolog. Res. 2, 77

88 Asakawa, T. & Matsushita, S. (1979)
Lipids, 14, 401
89 Christophersen, B.O. (1968)
Biochim. Biophys. Acta, 164, 35
90 Cutteridge, J.M.C. (1978)
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 22, 563
91 Di Luzio, N.T. (1968)
Exp. Mol. Pathol. 8, 394
92 Hashimoto, S. & Recknagel, R.O. (1968)
Exp. Mol. Pathol. 8, 225
93 Mc Donald, C.M. (1973)
FEBS-Letters 35, 227
94 Slater, T.F. (1975)
in: Pathogenesis and Mechanisms of Liver Cell Necrosis (Edit: Keppler, D.)
MTP Press, Lancaster, p. 209
95 Flohé, L., Loschen, G., Azzi, A. & Richter, Ch. (1977)
in: Superoxide and Superoxide Dismutases (Edit: Michelson, A.M.,
Mc Cord, J.M., Fridovid, I.)
Academic Press, London, p. 323
96 Chance, B. & Oshino, N. (1971)
Biochem. J. 122, 225
97 Boveris, A., Oshino, N. & Chance, B. (1972)
Biochem. J. 128, 617
98 Vladimirov, Yu. A., L'vova, O.F. & Cherenisina, Z.P. (1965)
Biokhimiya, 31, 442
99 Gorus, F. & Schram, E. (1979)
Clin. Chem. 25, 512
100 Wilson, D.F., Dutton, P.L. & Wagner, M. (1973)
in: Current Topics in Bioenergetics (Edit: Sandai, D.R., Packer, L.)
Academic Press, N.Y., 5, p.233
101 Yu, C.A., Nagaoka, S., Yu, L. & King, T.E. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1070
102 Chance, B., Boveris, A., Nakase, Y. & Sies, H. (1978)
in: Functions of GSH in Liver and Kidney (Edit: Sies, H., Wendel, A.)
Springer Verlag, Berlin, p. 95
103 Weisinger, R.A. & Fridovich, I. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 4793
104 Gennaro, R. & Romeo, D. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 44

105 Peeters-Joris, Ch., Vandervoode, A.-M. & Bandhuin, P. (1975)
Biochem. J. 150, 31
106 Suwa, K., Kimura, T. & Schaap, A.P. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 785
107 Khan, A.U. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 615
108 Lynch, R.E. & Fridovich, I. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 4697
109 Krebs, J.J.R., Hauser, H. & Carafoli, E. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 5308
110 Bangham, A.D. & Mason, W. (1979)
Br. J. Pharmacol. 66, 259
111 Chin, J.H. & Goldstein, D.B. (1977)
Sci. 196, 684
112 Behar, D., Czapski, G., Rabini, J., Dorfman, L.M. & Schwartz, H.A. (1970)
J. Physiol. Chem. 74, 3209
113 Koppenol, W.H. & Butler, J. (1977)
FEBS-Letters, 83, 1
114 Mannella, C.A.& Parsons, O.F. (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 460, 375
115 Zimmer, G. (1977)
Eur. J. Biochem. 77, 349
116 Kargapolov, A.V. & Yaguzhinskii, L.S. (1978)
Biokhimiya, 43, 2150
117 Heytler, P.G. (1963)
Biochemistry 2, 357
118 Azzi, A., Montecucco, C. & Richter, Ch. (1975)
Biochem. Biophys. Res.Comm. 65, 597
119 Michelson, A.M. (1977)
in: Superoxide and Superoxide Dismutases (Edit: Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I.)
Academic Press, London, p. 245
120 Seki, H., Ilan, Y.A., Ilan, Y. & Stein, G. (1976)
Biochim. Biophys. Acta, 440, 573
121 Trumpower, B.L. & Simmons, Z. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 4608
122 Eruster, L. & Kuylenstierna, B. (1970)
in: Membranes of Mitochondria and Chloroplasts (Edit: Racker, E.)
Van Nostrand Reinhold Comp., N.Y., p. 172

123 Kiessling, K.-H. & Pilström, L. (1973)
Biochem. Pharmacol. 22, 2229
124 Israel, Y., Videla, L. & Bernstein, J. (1975)
Fed. Proc. 34, 2052
125 Gordon, E.R. (1977)
Alcoholism: Clin. Experimental Res., 1, 21
126 Pirola, R.C. & Lieber, C.S. (1972)
Pharmacol. 7, 185
127 Bleyman, M.A. & Thurman, R.G. (1979)
Biochem. Pharmacol. 28, 2027
128 Feinman, L., Baraona, E., Matsuzaki, S., Korsten, M. & Lieber, C.S. (1978)
Alcoholism: Clin. Experimental Res. 2, 391
129 Taborsky, G. & Mc Collum, K. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7069
130 Mokhava, E.N., Skulachev, V.P. & Zhigacheva, I.V. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 501, 415
131 Vanderkooi, J., Erecinska, M. & Chance, B. (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 154, 219
132 Cederbaum, A.I. & Rubin, E. (1975)
Fed. Proc. 34, 2045
133 Wilson, D.F., Erecinska, M., Drown, Ch. & Silver, I.A. (1977)
Am. J. Physiol. 233, C 135
134 Quistorff, B., Chance, B., & Takeda, H. (1978)
in: Frontiers of Biological Energetics (Edit: Dutton, P.L., Leigh, J.S., Scarpa, A.) Vol. II, Academic Press., N.Y., p. 148
135 Guarnieri, C., Ferrari, R., Visioli, O., Caldarera, C.M. & Nayler, W.G. (1978)
J. Mol. Cellular Cardiology 10, 893
136 Nakazawa, T. & Nunokawa, T. (1977)
J. Biochem. 82, 1575
137 Reitz, R.C., Helsabeck, E. & Mason, A.P. (1973)
Lipids 8, 80
138 Brady, P.S., Brady, L.J. & Ullrey, D.E. (1979)
J. Nutr. 109, 1103
139 Littleton, J.M. & John, G. (1977)
J. Pharm. Pharmacol. 29, 579
140 Reith, A., Schüler, B. & Vogell, W. (1968)
Z. Zellforschung 89, 225

141 Sun, G.Y.,& Sun, A.Y. (1978)
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 21, 355
142 Schubetz, R., Goebel, K.M. & Kaffarnik, H. (1976)
Klin. Wschr. 54, 827
143 Thompson, J.A. & Reitz, R.C. (1978)
Lipids 13, 540
144 Osanai, A. & Sakagami, T. (1979)
J. Biochem. 85, 1453
145 Ananda Rao, G., Siler, K. & Larkin, E.C. (1978)
Lipids 13, 356
146 Hosein, E.A., Hofmann, I. & Linder, E. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 183, 64
147 Koch, O.R., Boveris, A. & Stoppani, A.O.M. (1977)
in: Alkohol and Aldehyde Metabolizing Systems (Edit: Thurman, R.G., Williamson, J.R., Drott, H., Chance, B.) Vol. II
Academic Press, N.Y., p. 441
148 Banks, W.L. Jr., Kline, E.S. & Higgins, E.S. (1970)
J. Nutr. 100, 581
149 Israel, Y., Videla, L. & Bernstein, J. (1975)
Fed. Proc. 34, 2052
150 Haslam, J.M., Spithill, T.W. & Linnane, A.W. (1973)
Biochem. J. 134, 949
151 Keyes, W.G. & Heimberg, M. (1979)
J. Clin. Invest. 64, 182
152 De Mendoza, D., Moreno, H., Massa, E.M., Morero, R.D. & Farias, R.N. (1977)
FEBS-Letters 84, 199
153 Thiel, D.H.V., Gavaler, J.S., Lester, R.& Sherius, R.J. (1978)
J. Clin, Invest. 61, 624
154 Bader, F.M., Bartke, A., Dalterio, S. & Bulger, W. (1977)
Steroids 30, 647
155 Ammon, H.P.T. & Estler, C.J. (1967)
Nature 216, 158
156 Floridi, A., Blotta, I. & Marcante, M.L. (1973)
Experientia 29, 1228
157 Bligny, R. & Douce, R. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 529, 419

158 Al-Shaihlaly, M.M. & Baum, H. (1977)
Biochem. Soc. Transactions 5, 1093

159 Shah, J.H., Bowser, E.N., Hargis, G.K., Wongsurawat, N., Banerjee, P., Henderson W.J. & Williams, G.A. (1978)
Metabolism 27, 257

160 Mezey, E., Potter, J.J. & Kvetnanský, R. (1979)
Biochem. Pharmacol 28, 657

161 Christiansson, A. & Wieslander, Å. (1977)
Eur. J. Biochem. 85, 65

162 Okuyama, H., Yamada, K., Kameyama, Y., Ikezawa, H., Akamatsu, Y. & Nojima, S. (1977)
Biochem. 16, 2668

163 Mc Burney, L.J. & Radomski, M.W. (1973)
Comp. Biochem. Physiol. 44B, 1219

164 Griffiths, D.E., Hyams, R.L., Bertoli, E., Carver, M. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 449

165 Grinna, L.S. (1977)
Mechanisms of Ageing & Development 6, 197

166 Kargapolov, A.V. (1979)
Biokhimiya 44, 293

167 Baumgartner, W.A., Hill, V.A. & Wright, E.T. (1978)
Mechanisms of Ageing & Development 8, 311

168 Csallany, A.S., Ayaz, K.L & Su, L.-C. (1977)
J. Nutr. 107, 1792

169 Babior, B.M. (1978)
N. Engl. J. Med. 298, 659

170 Dioguardi, N., Idio, G., Podda, M. & Del Ninno, E. (1970)
Schweiz. med. Wschr. 100, 1698

171 Hicks, M. & Gebicki, J.M. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 704

172 Ivanov, A.S., Putvinskii, A.V., Antonov, V.F. & Vladimirov, Yu.A. (1977)
Biofizika 22, 621

173 Dobretsov, G.E. Borschevskaja, T.A., Petrov, V.A. & Vladimirov, Yu.A. (1977)
FEBS-Letters 84, 125

174 Nohl, H., Breuninger, V. & Hegner, D. (1978)
Eur. J. Biochem. 90, 385

175 Turovetsky, V.B., Pozdnyakov, S.P. & Danilov, V.S. (1978)
Biofizika 23, 1019

176 Chien, K.R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J.T. & Farber, J.L. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 4809

177 Sobel, B.E., Corr, P.B., Robison, A.K., Goldstein, R.A., Witkowski, F.X. & Klein, M.S. (1978)
J. Clin. Invest. 62, 546

178 Kamataki, T., Sugita, O., Ozawa, N. & Kitagawa, H. (1977)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 40, 283

179 Kamataki, T., Sugita, O., Kitada, M., Naminohira, S. & Kitagawa, H. (1977)
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 17, 265

180 Parce, J.W., Cunningham, C.C. & Waite, M. (1978)
Biochemistry 17, 1634

181 Mukai, F.H. & Goldstein, B.D. (1976)
Sci. 191, 868

182 Nielsen, H. (1978)
Lipids 13, 253

183 Baker, S.P. & Hemsworth, B.A. (1978)
Biochem. Pharmacol. 27, 805

184 Rana, R.S. & Munkres, K.D. (1978)
Mechanisms of Ageing & Development 7, 241

185 Hayflick, L. (1978)
Fed. Proc. 38, 1847

186 Pryor, W.A. (1978)
Photochem. Photobiol. 28, 787

187 Yau, T.M. (1979)
Mechanisms of Ageing & Development 11, 137

188 Radda, G.K. & Vanderkooi, J. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 265, 509

189 Fee, J.A. & Valentine, J.S. (1977)
in: Superoxide & Superoxide Dismutases (Edit: Michelson, A.M., Mc Cord, J.M., Fridovich, I.)
Academic Press, London, p. 19

7. ABKÜRZUNGEN und DEFINITIONEN

7.1. Abkürzungen

ACR:	Atmungskontrollquotient: Acceptor-Control-Ratio
LPO:	Lipidperoxidation
EtOH:	Äthanol; meist mit "Alkohol" bezeichnet
MDA:	Malondialdehyd
BM:	Basismedium
Succ:	Succinat, Dinatriumsalz
ß-HOB:	ß-Hydroxybutyrat, Natriumsalz

7.2. Definition von Energetisierung und Kopplung

Die Mitochondrienmembran wird vorwiegend durch Atmung energetisiert, d.h. sie wird arbeitsfähig, in dem sie die Energieübertragung auf Akzeptoren vermitteln kann. Bei der Energetisierung kommt es formal durch die anisotrope Verteilung der Bestandteile H^+ und OH^- des Reaktionsproduktes Wasser zu einer maximalen Polarisierung der Membran unter Vergrößerung der Oberflächenladungsdichte. Dieser Zustand kann deshalb durch Fluoreszenzfarbstoffe erfaßt werden.

Entsprechend dem Anstieg der negativen Oberflächenladungsdichte sinkt die Löslichkeit anionischer Fluoreszenzindikatoren wie 8-Anilinonaphthyl-1-sulfonsäure (ANS) in der Membranoberfläche und damit die Fluoreszenz ab, was somit eine übliche Nachweismethode für Energetisierung ist (s.188).

Energetisierung und Kopplung sind aber nicht synonym. Energetisierte Mitochondrien sind immer gekoppelt, aber gekoppelte Mitochondrien können z.B. auch anaerob oder deenergetisiert sein, wie sie es in Gegenwart von Energieakzeptoren (z.B. ADP) sind. Energetisierung also ist ein Zustand, Kopplung dagegen ein Kriterium funktioneller Integrität unabhängig vom jeweiligen funktionellen Zustand der Mitochondrienmembran. Da Mitochondrien zwei Membranen besitzen, eine äußere und eine innere, nur die innere aber arbeitsfähig ist, soll nur diese hier betrachtet werden.

8. ANHANG

8.1. Die Wirkung von Entkopplern auf den ACR

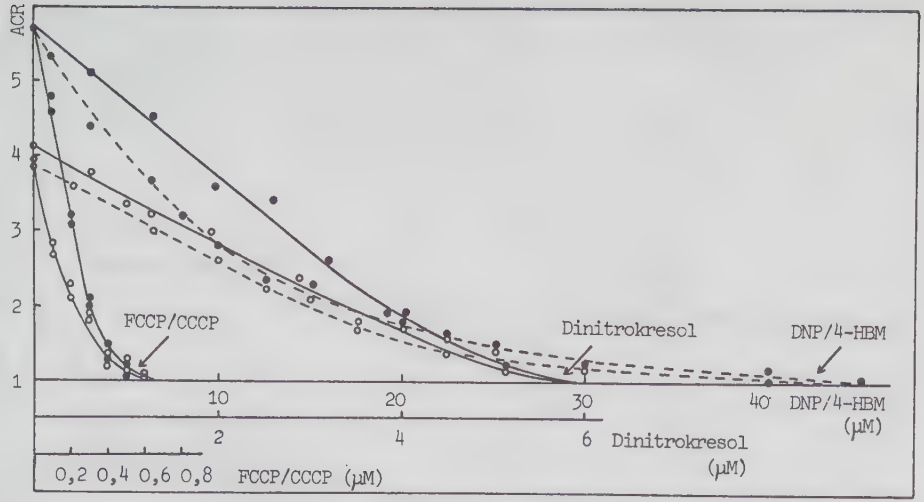


Abb. I: Abhängigkeit des ACR von der Konzentration verschiedener Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung

Die Bestimmung erfolgte wie in den Methoden beschrieben. ß-Hydroxybutyrat (●), Succinat (o) dienten als Substrate der mitochondrialen Atmung.

8.2. Redoxpotentiale verschiedener Entkoppler

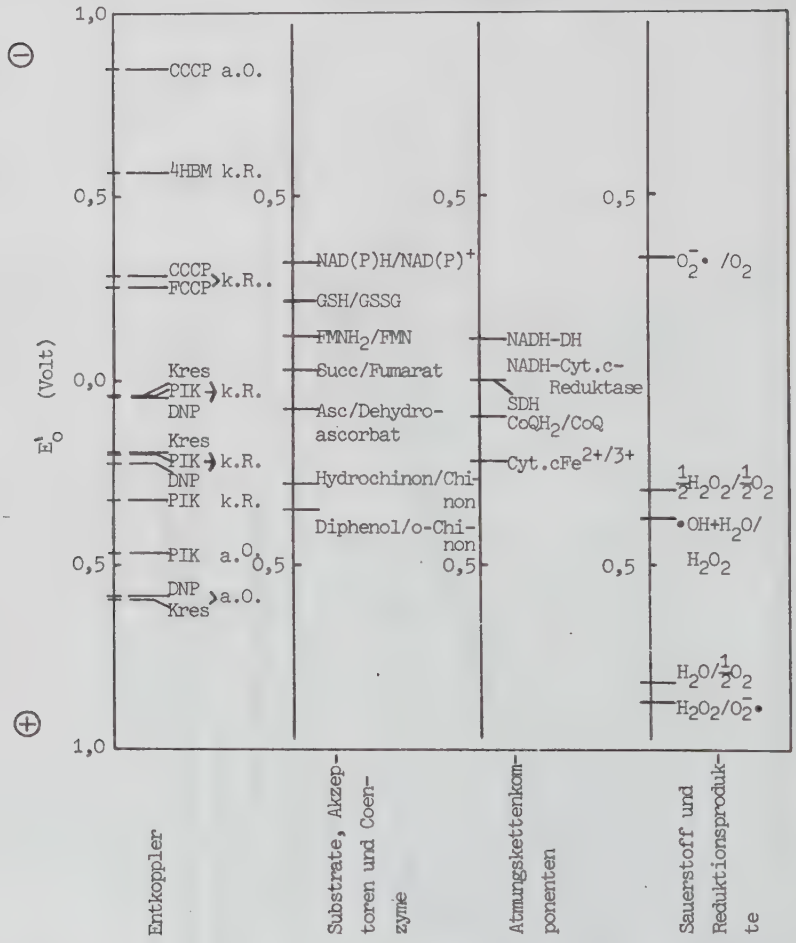
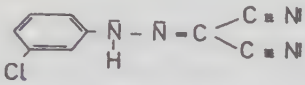


Abb. II: Redoxpotentiale (E'_o: pH7, hier: 20°C) verschiedener Entkoppler eingeordnet in die Spannungsreihe einiger relevanter Substrate und Atmungskettenkomponenten, sowie O_2 und seine Reduktionsprodukte.
Die Bestimmung der Entkopplerpotentiale erfolgte wie in den Methoden angegeben, andere Potentiale wurden aus einschlägigen Lehrbüchern entnommen; die Potentiale der Sauerstoffspezies stammen aus einer Zusammenstellung

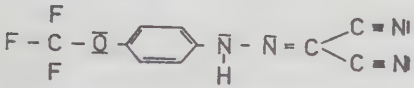
von Fee&Valentine (189).

Es bedeutet: a.O.: anodische Oxidation: k.R. kathodische Reduktion; Asc: Ascorbinsäure; SDH: Succinatdehydrogenase; CoQ: Coenzym Q

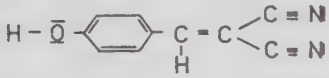
CCCP: m-Chlor-Carbonylcyanid-Phenylhydrazon



FCCP: p-Trifluor-Methoxy-Carbonylcyanid-Phenylhydrazon



4HBM: 4-Hydroxybenzyliden-Malondinitril



Kres: 2,4-Dinitrokresol

DNP: 2,4-Dinitrophenol

PIK: Pikrinsäure

8.3. Fettsäurenzusammensetzung der Diäten

	Altromin Sonderdiät C1000:	
	mit 3% Palmin (Kokosnußöl) (mg/kg Diät)	mit 3% Sojaöl (mg/kg Diät)
Capronsäure	240	-
Caprylsäure	1620	-
Caprinsäure	2520	-
Laurinsäure	13620	60
Myristinsäure	5400	30
Palmitinsäure	3150	2940
Stearinsäure	690	720
Arachinsäure	120	270
Ölsäure	2250	8670
Linolsäure	Spuren	15210
Linolensäure	-	1950

Alle Angaben stammen vom Hersteller.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:
E. Bayer, E. Betz, U. Feine, K.G. Grell, J. Guglielmi, E. Kallee,
H. Krüger, H. Mauser, D. Mecke, H. Metzner, K. Mörike, E. Müller,
E. Pfaff, H. Remmer, M. Siess, W. Rüdorff, G. Weitzel, U. Weser,
W. Zeil

Lebenslauf

Am 19. Juli 1949 wurde ich auf der Insel Nordstrand, Kreis Nordfriesland, geboren. Meine Eltern sind Joachim Haselbach, Milchkontrolleur auf der Insel, und Martha Haselbach, geb. Knudsen, Hausfrau. Ich habe noch drei Geschwister.

Ab Ostern 1956 besuchte ich die Volksschule auf Nordstrand und zwar bis Ostern 1960. Von da an war ich Schüler der Dörfergemeinschaftsschule Nordstrand: zwei Jahre lang als Volksschüler bis Ostern 1962 und dann bis Ostern 1966 als Mittelschüler. Die Mittelschule verließ ich mit dem Zeugnis der Mittleren Reife. Dann besuchte ich die Ländliche Oberschule in Niebüll. Nach dreijähriger Schulzeit legte ich dort im Sommer 1969 das Abitur ab.

Am 01. Juli 1969 trat ich als Soldat auf Zeit für zwei Jahre in die Bundeswehr ein, die ich mit dem Dienstgrad eines Leutnant der Reserve verließ.

Nach meiner Dienstzeit begann ich in Tübingen das Biochemiestudium im Oktober 1971. Das Grundstudium schloß ich im September 1974 mit dem Vordiplom ab.

Nach Bestehen der mündlichen Hauptprüfung begann ich im Juni 1977 meine Diplomarbeit "Untersuchungen zur Lipidautoxidation bei Rattenlebermitochondrien unter dem Einfluß von chronischen Äthanolgaben" im Toxikologischen Institut unter Anleitung von Doz. Dr. E. Pfaff.

Nach Abschluß der Diplomarbeit im November 1977 wurde von Januar 1978 bis Januar 1980 die vorliegende Dissertation "Alkohol und Lipidperoxidation in Rattenlebermitochondrien: Einfluß von Geschlecht, Diät und Sauerstoffdruck" angefertigt. Der Doktorvater war Prof. Dr. E. Pfaff.

Seit dem Frühjahr 1975 bin ich mit der Krankengymnastin Elvira Haselbach, geb. Frueth, verheiratet. Am 10. Mai 1977 wurde unser Sohn Roman geboren.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791